



**Universidade de Aveiro**  
**Ano 2016**

Departamento de Química

**Renato Daniel Almeida  
Guimarães**

**Avaliação do Índice Peróxidos e Acidez de matérias-  
primas e de alimentos compostos para animais ao longo  
do armazenamento**





Universidade de Aveiro  
Ano 2016

Departamento de Química

**Renato Daniel Almeida Guimarães** Avaliação do Índice Peróxidos e Acidez de matérias-primas e de alimentos compostos para animais ao longo do armazenamento.

**NºMec. 75087**

Tese apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, com especialização em Biotecnologia Alimentar, realizada sob a orientação científica da Doutora Elisabete Coelho, Bolseira de Pós Doutoramento, e do Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva, Professor associado com agregação, do Departamento de Química da Universidade de Aveiro



## **O Júri**

Presidente

Professor Doutor João Manuel da Costa e Araújo Pereira Coutinho ,  
Professor Catedrático, Universidade de Aveiro

Arguente

Professora Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo,  
Professora Associada com Agregação, Universidade de Aveiro

Orientador

Professor Doutor Manuel António Coimbra Rodrigues da Silva,  
Professor Associado com Agregação, Universidade de Aveiro



## **Agradecimentos**

Agradeço às minhas orientadoras Doutora Elisabete Coelho e Mestre Susana Santos por toda a disponibilidade ao longo deste ano, por todos os conselhos e ensinamentos. Por me ensinarem a aprender.

Agradeço ao Professor Doutor Manuel António Coimbra pela disponibilização do laboratório na Universidade de Aveiro e por todos os conselhos ao longo do estágio e da elaboração da Dissertação.

Agradeço à empresa Ovargado S.A., pela oportunidade que me foi dada de poder estagiar e pela cooperação e compreensão ao longo de todo o ano.

Ao Sr. Marinheiro, pelas horas infinitas de ensinamento e aconselhamento, tanto de trabalho como da vida.

À Dr<sup>a</sup> Odília, Dr<sup>a</sup> Rosário, Eng<sup>o</sup> André Silva, Dr<sup>a</sup> Alexandra Dias, Dr<sup>a</sup> Aurelina, Sr. João Branco, Sr. Artur, João Ferreira, ao Miguel e a todos os colaboradores da Ovargado que sempre se disponibilizaram a ajudar no desenvolvimento do meu trabalho.

Ao João Cardoso, por todo o legado que deixou na minha forma de ser e estar e por estar lá sempre, mesmo quando está longe.

Ao Daniel Silva, o meu companheiro a todos os níveis, por todo o incentivo, ajuda e distrações, tudo no momento certo.

A todos os meus companheiros ao longo destes seis anos, da Covilhã a Aveiro, da Polónia a Avanca.

Ao meu fiel escudeiro Eng<sup>o</sup> José Fernando, a nossa caminhada não acaba aqui.

À minha Mariana, a minha eterna melhor amiga e uma das minhas maiores forças.

Ao João Couras e ao Paulinho da Avimato, que estão cá desde sempre.

E porque a um nível visível a base de algo está na parte inferior, ao Manuel Guimarães, à Paula Guimarães e à Mariana Guimarães, também apelidados por mim como Pai, Mãe e Irmã. Sem vocês, nunca teria cá chegado, sem vocês nunca irei chegar a nenhum lado.





## Palavras-chave

*Pet food*; Subprodutos de origem animal; Oxidação lipídica; Extração de gordura animal; Índice de Peróxidos; Índice de Acidez.

## Resumo

A indústria de pet food tem assistido a um crescimento, tanto a nível internacional como a nível nacional, devido a uma certa “humanização” dos animais de estimação. Esta tendência no segmento pet food leva ao crescimento da oferta e, naturalmente, procura de produtos de melhor qualidade. Matérias-primas como farinhas de subprodutos de origem animal ou gorduras animais são parte essencial na constituição de alimentos compostos para animais de companhia. Os subprodutos de origem animal mais utilizados são as farinhas de carne, carne e osso e penas, como também as gorduras: animal (mistura de diferentes espécies) e de aves. Todos os subprodutos são ricos em gorduras compostas por triacilgliceróis que, dependendo da matriz e da composição em ácidos gordos, podem ser mais ou menos suscetíveis à oxidação. A taxa de oxidação é influenciada por diversos fatores como presença de oxigénio, altas temperaturas e exposição à luz, que poderá promover a formação de radicais livres. O objetivo do trabalho, realizado em ambiente empresarial na empresa Ovargado S.A., passou pela implementação de metodologias de análise para avaliação do índice de peróxidos e índice de acidez de várias matérias-primas e de produto final destinado a animais de companhia. Foram feitos ensaios ao longo do tempo de armazenamento, em diferentes tipos de embalagem e locais de armazenamento. O processo de extração de gordura foi otimizado quanto ao rácio massa/solvente (n-hexano), tempo de agitação e o número de renovações de solvente. Posteriormente, foram utilizadas diversas farinhas de subproduto animal, com diferentes teores de gordura, sendo a extração efetuada nas seguintes condições otimizadas: 6 mL de solvente por grama de amostra durante 40 minutos e com 4 renovações de solvente. As amostras de matérias-primas utilizadas incluíram diferentes teores de gordura num intervalo de 7% a 22% no caso das farinhas de origem animal. O valor máximo encontrado relativamente à oxidação lipídica foi de 4,71 mmol de oxigénio por kg de amostra na gordura de aves com 2,2% de acidez. Os teores de gordura nos produtos finais variaram num intervalo de 9,0% a 15,2%, sendo submetidos a diferentes condições de ensaio e armazenamento. O produto final que sofreu maior peroxidação foi o Tipo 2 (ração de Cachorros) com 8,2 mmol/kg, o maior aumento de acidez registou-se na ração Tipo 4 (ração canina de Alta Energia) com um aumento de 2,8% e ambos os casos se deram no tipo de saco mais permeável ao oxigénio e no local com maior temperatura e exposição à luz e ao ar.



**Keywords**

*Pet food ; Animal by-products ; Lipid oxidation ; Animal fat extraction ; Peroxide index; Acidity index.*

**Abstract**

Due to the "humanization" of pets, we have seen a significant growth within the pet food industry, both internationally and nationally. This trend has increased the supply and demand for better quality pet food products. Feedstock such as meal products of animal origin or animal fat is an essential ingredient in the formulation of feeds for pets. The most widely used animal by-products are meat meal, poultry meal, as well as chicken fat. All by-products are rich in fats consisting of triacylglycerols which may be more or less susceptible to oxidation depending on the composition of the matrix and fatty acids. The oxidation rate is influenced by several factors such as the presence of oxygen, high temperatures and exposure to light, which can lead to the formation of free radicals. The objective of this work, developed at Ovargado S.A., included the implementation of analytical methods for evaluation of the peroxide value and acidity index of several animal feedstock and final products for pets during the storage, under different conditions. The process of fat extraction was optimized for mass/solvent ratio (n-hexane), stirring time and number of extractions. Several animal by-product meals containing different fat contents were used, and the extraction was performed with the following optimized conditions: 6 mL of solvent per gram of sample for 40 minutes in order to complete four solvent re-newals. The samples of feedstock used in the study ranged in fat contents between 7% and 22% for meals, and the maximum value for lipid oxidation was 4.7 mmol of oxygen per kg on chicken fat, and the acidity was 2.2%. The fat content in the final products varied within a range of 9.0% to 15.2%, Pet food was subjected to different conditions of storage and bagging. The highest peroxidation level was observed for type 2 feed (Puppies) with 8.2 mmol/kg and 2.8% was the highest increase observed in acidity in feed type 4 (High Energy). In both cases these values were attained with the package more permeable to oxygen stored in the local with higher temperature and light and air exposure.



# Índice

Lista de tabelas .....	i
Lista de Figuras .....	iv
<b>1. Enquadramento teórico.....</b>	<b>1</b>
1.1 O setor <i>Pet Food</i> .....	1
1.2 Ovargado, S.A. ....	5
1.3 Segmentos de <i>Pet Food</i> .....	6
1.4 Matérias-Primas e Necessidades Nutricionais .....	8
1.5 Processos de degradação de lípidos .....	21
<b>2. Objetivos do trabalho .....</b>	<b>34</b>
<b>3. Materiais e Métodos.....</b>	<b>35</b>
3.1 Extração de Gordura .....	35
3.2 Amostragem de Matérias-Primas .....	36
3.3 Amostragem de Produto final .....	39
3.4 Avaliação do Índice de Peróxidos e Acidez.....	41
<b>4. Resultados e Discussão .....</b>	<b>44</b>
4.1 Extração de Gordura .....	44
4.2 Avaliação de Peróxidos e Acidez em Matérias-Primas .....	46
4.3 Índice de Peróxidos e Acidez em produto final .....	57
<b>5. Considerações Finais .....</b>	<b>70</b>
<b>6. Trabalho Futuro .....</b>	<b>73</b>
<b>7. Referências Bibliográficas.....</b>	<b>74</b>

## **Lista de tabelas**

**Tabela 1:** Crescimento (em mil milhões de euros) dos valores de vendas de *Pet Food* (e sub-categorias Cães, Gatos e Outros Produtos) na União Europeia e crescimento médio anual (%). Adaptado de Market Access Secretariat (2016);

**Tabela 2** - Níveis mínimos de nutrientes recomendados para Cães- por 100 gramas de matéria seca (Adaptado de F.E.D.I.A.F.Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, Janeiro de 2016)

**Tabela 3** - Níveis mínimos de nutrientes recomendados para Gatos - por 100 gramas de matéria seca (Adaptado de F.E.D.I.A.F.Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, Janeiro de 2016)

**Tabela 4** - Especificações de qualidade de algumas farinhas de origem animal (Adaptado de Butolo, J.E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. Colégio de Nutrição Animal; Acesso em Janeiro de 2016).

**Tabela 5** - Caracterização da amostra utilizada na otimização do processo de extração; Análise obtida por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) (%);

**Tabela 6** – Caracterização química obtida por NIR das diferentes amostras de matéria-prima utilizadas;

**Tabela 7** – Caracterização das diversas amostras de produto final utilizadas ao longo do estudo;

**Tabela 8** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final (% em relação à constituição total);

**Tabela 9** – Volume de solvente, tempo de extração e número de extrações relativos aos diferentes métodos de extração de gordura e resultados obtidos em 20 gramas de amostra;

**Tabela 10** – Volume de solvente, tempo de agitação/contacto e número de renovações de solvente relativos às diferentes matérias-primas e resultados obtidos;

**Tabela 11** – Acompanhamento do Índice de Peróxidos de Gordura de Aves sem adição de antioxidante (mmol/kg);

**Tabela 12** – Acompanhamento do Índice de Peróxidos de Gordura de Aves com adição de antioxidante (mmol/kg);

**Tabela 13** – Avaliação do Índice de Acidez de gordura de Aves sem adição de antioxidante (%);

**Tabela 14** – Avaliação do Índice de Acidez de gordura de Aves com adição de antioxidante (%);

**Tabela 15** - Índice de Peróxidos e Acidez inicial nas diversas matérias-primas no momento da recepção da matéria-prima;

**Tabela 16** – Relacionamento dos diferentes subprodutos de origem animal e respectivos teores em gordura e proteína (Determinados por NIR) com a variação de peróxidos e acidez ao fim de 6 e 12 dias;

**Tabela 17** - Relação entre o teor de Gordura (analisado por NIR) e os valores de Peróxidos e Acidez iniciais dos diferentes tipos de produto final;

**Tabela 18** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final Tipo 1-Manutenção (% em relação à constituição total);

**Tabela 19** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final Tipo 2- Cachorros (% em relação à constituição total);

**Tabela 20** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final Tipo 3- Gatos (% em relação à constituição total);

**Tabela 21** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final Tipo 4- Alta Energia e Tipo 5- Alta Energia Extra (% em relação à constituição total);



## Lista de Figuras

**Figura 1:** Aspecto visual de um tipo de ração seca e um tipo de ração húmida e também Semi-húmida; Fonte: Estrela-Animal [ttp://www.estrelanimal.pt/caes/alimentacao.html](http://www.estrelanimal.pt/caes/alimentacao.html)), Texture Technologies (<http://texturetechnologies.com/blog/images/petfood.jpg>) e HRS4pets (<http://hrs4pets.com/about-dog-food/>), (Acesso em Janeiro de 2016);

**Figura 2:** Imagem representativa do Ácido Linoleico Ómega 6 e do Ácido Linolénico Ómega 3; (Retirado de: [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K1472611](http://parts.igem.org/Part:BBa_K1472611)) Acesso em Janeiro de 2016;

**Figura 3:** Formação de hidroperóxido por reação de singlete de oxigénio (Retirado de Talbot, 2016);

**Figura 4:** Estrutura de diferentes poliaminas (Adaptado de [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org); Janeiro de 2016);

**Figura 5:** Oxidação do complexo (P-  $\text{Fe}^{2+}$ ) e formação de hidroperóxidos pelos radicais originados no processo. Retirado de Belitz et al. (2009);

**Figura 6:** Formação de espécies do tipo oxeno e posteriores oxidações, formando radicais que iniciarão a oxidação lipídica. Retirado de Beltiz et al. (2009);

**Figura 7:** As três fases da oxidação lipídica de ácidos gordos insaturados; Retirado de: Melo, E. A.; Guerra, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. Boletim da SBCTA, Campinas, vol.36, n.1, p.1-11, 2002;

**Figura 8:** Passos da autooxidação lipídica. Adaptado de Belitz et al. (2009);

**Figura 9:** Mecanismo da clivagem de um hidroperóxido, com Hexanal como produto final (Retirado de: Belitz et al.; 2009);

**Figura 10:** Mecanismo de autooxidação da Trilinoleína; (Adaptado de: Frankel, 1990);

**Figura 11:** Esquema representativo da passagem do silo exterior a 45°C para um silo interior a 85°C (adaptado de [www.renoger.com](http://www.renoger.com), Acesso em Dezembro de 2016);

**Figura 12:** Tipos de embalagem utilizadas. Esquerda: Papel. Direita: Ráfia (Elaborado pelo autor);

**Figura 13:** Evolução do Índice de Peróxidos em Gordura de Aves sem e com adição de antioxidante (mmol/kg);

**Figura 14:** Acompanhamento do Índice de Acidez em Gordura de Aves com e sem adição de antioxidante 85 °C (%);

**Figura 15:** Acompanhamento do Índice de Peróxidos de diferentes fornecedores de farinha de carne, armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (mmol/kg) ;

**Figura 16:** Acompanhamento do Índice de Acidez em diferentes tipos de farinha de carne, armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (%);

**Figura 17:** Evolução do Índice de Peróxidos em diferentes subprodutos de origem animal armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (mmol/kg);

**Figura 18:** Evolução do índice de acidez em diferentes subprodutos de origem animal armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (%);

**Figura 19:** Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 1- Manutenção ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg);

**Figura 20:** Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 1-Manutenção ao longo do tempo de armazenamento (%);

**Figura 21:** Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 2-Cachorros ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg);

**Figura 22:** Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 2-Cachorros ao longo do tempo de armazenamento (%);

**Figura 23:** Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 3-Gatos ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg);

**Figura 24:** Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 3-Gatos ao longo do tempo de armazenamento (%);

**Figura 25:** Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 4-Alta Energia e Tipo 5-Alta Energia Extra ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg);

**Figura 26:** Acompanhamento do índice de acidez em produto final do tipo 4 e 5 ao longo do tempo de armazenamento (%);

**Figura 27:** Relação entre valor de peróxidos e teor de gordura na referência Local2-Ráfia de todos os produtos finais: Tipo 1-Manutenção, Tipo 2-Cachorros, Tipo 3-Gatos, Tipo 4-Alta Energia, Tipo 5-Alta Energia Extra;

**Figura 28:** Relação entre índice de acidez e teor de gordura na referência Local2-Ráfia de todos os produtos finais: Tipo 1-Manutenção, Tipo 2-Cachorros, Tipo 3-Gatos, Tipo 4-Alta Energia, Tipo 5-Alta Energia Extra;



# 1. Enquadramento teórico

## 1.1 O setor *Pet Food*

Tanto a nível internacional como a nível nacional se tem assistido a um crescendo da indústria de *pet food* (alimentos para animais de estimação) e de *pet care* (produtos e serviços de estética higiene e limpeza para animais) o que de certa forma ilustra a forma como os “donos” olham para os seus animais de estimação – considerando-os quase como um membro das suas próprias famílias. Esta “humanização” por parte da sociedade tem conduzido a uma expansão destes sectores. Calcula-se que existam cerca de 800 milhões de cães e gatos em todo o mundo sendo criados como “membros da família” (AEP, 2012)

Este crescendo reflecte-se tanto em Portugal como no resto do Mundo e está directa e indirectamente relacionado com o aumento da expectativa de vida da população humana assim como o aumento da densidade populacional idosa, redução do número de filhos, e uma grande parte deve-se também a uma maior carência afectiva por parte das pessoas. Consequentemente, esta tendência no segmento dos alimentos para animais de estimação leva ao crescimento da oferta e, naturalmente, do consumo de produtos de melhor qualidade, que não só alimentem adequadamente os seus animais, como também lhes proporcionem melhor qualidade de vida (AEP, 2012).

Assim sendo, os conceitos de nutrição não consideram apenas questões de sobrevivência animal e saciação. As necessidades mínimas do animal já não são suficientes para o desenvolvimento de novos produtos e cada vez mais se procura perceber o papel da nutrição na promoção de saúde e bem-estar (Carciofi e Jeremias, 2010). Hoje, a nutrição animal não assenta só na construção, manutenção do organismo e fornecimento de energia, mas também procura integrar uma dimensão preventiva e, por vezes, terapêutica e ao contrário dos objectivos dos primeiros tempos de desenvolvimento de ração animal, abandonou-se o conceito de “sobrevivência”, o mínimo necessário para a manutenção da vida do animal (AEP, 2012).

Este conceito evoluiu em função do conhecimento científico existente, nomeadamente no que diz respeito ao interesse de certos ingredientes para a saúde, levando a uma adequação da composição nutricional, da matriz de ingredientes,

processamento dos alimentos, às necessidades específicas de cada estágio de vida e à condição fisiológica (Carciofi e Jeremias, 2010; Fahey, 2003).

A pesquisa/desenvolvimento nutricional a nível de *pet foods* tem como objectivo atingir diversas áreas. É agora de grande valor priorizar a utilização de alimentos que melhorem a qualidade de vida do animal, bem-estar, imunidade, beleza e saúde de pele e pelos, função digestiva, função cognitiva, saúde oral, assim como promover maior longevidade, saúde e também actuar a nível de prevenção de doenças (Carciofi e Jeremias, 2010; Fahey, 2003).

Este conceito está cada vez mais direccionado na obtenção de dietas balanceadas que aumentem a qualidade de vida do animal através da utilização de formulações e ingredientes que permitam o desenvolvimento da capacidade de resistir a doenças e que melhorem a saúde do animal (Carciofi e Jeremias, 2010; Tzortzis et al., 2003).

Desde o início deste novo século a esperança de vida de cães e gatos aumentou significativamente, devido a fatores como melhoria da nutrição, controle de doenças infecciosas e aos avanços na medicina veterinária (Fahey et al., 2008).

Em 2014, a União Europeia era o segundo maior mercado a nível mundial em relação a *pet food*, com um valor de mercado em vendas de 20,6 mil milhões de euros, registando um crescimento anual médio de 3,2% nos anos compreendidos entre 2010 e 2014. Pela Euromonitor International, prevê-se que o crescimento deste mercado até 2019 atinja valores de mercado de 24,1 mil milhões de euros (Market Acces Secretariat, 2016). Dos 20,6 mil milhões de vendas neste sector em 2014, o segmento de alimentos compostos para cães representava um valor de cerca de 9,9 mil milhões de euros na União Europeia e de 9,7 mil milhões de euros no segmento de gatos.

**Tabela 1:** Crescimento (em mil milhões de euros) dos valores de vendas de *Pet Food* (e sub-categorias Cães, Gatos e Outros Produtos) na União Europeia e crescimento médio anual (%). Adaptado de: Market Access Secretariat (2016);

<b>Categorias</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>Crescimento médio anual</b>
<b><i>Pet Food</i></b>	<b>18,9</b>	<b>19,5</b>	<b>20,2</b>	<b>20,8</b>	<b>21,4</b>	<b>3,17</b>
<b>Cães</b>	8,78	9,07	9,37	9,64	9,92	3,10
<b>Gatos</b>	8,5	8,82	9,15	9,44	9,73	3,42
<b>Outros Produtos</b>	1,64	1,68	1,72	1,75	1,79	2,19

Entre Janeiro de 2011 e Agosto de 2015 foram registados cerca de 9078 novos produtos no sector de *pet food* na União Europeia, sendo que mais de metade (59,1%) representava produtos inovadores e 27,1% eram variedades de produtos já existentes.

A Europa Ocidental e os Estados Unidos são os principais mercados de *pet care*, contribuindo com mais de 70% de quota. Quanto aos produtos de saúde para animais de estimação salienta-se quevaliam 13,3 mil milhões de euros em 2008 (AEP, 2012). No que confere à Petfood, Portugal detinha em 2007 17% dos 10 milhões de euros afectos à indústria de petfood na Europa Ocidental, mercado onde o Reino Unido e França em conjunto detinham 57% do capital de negócio (AEP, 2012). Salienta-se que Espanha, Portugal e Áustria foram o grupo que evidenciou o maior crescimento médio anual entre 2002 e 2007 (em Portugal cresceu, em média, 3,7%) (AEP, 2012). Portugal acompanhou a tendência dos países ocidentais, a importância dos animais de estimação nos lares portugueses também tem vindo a aumentar, assim sendo, a “humanização dos animais” é também uma realidade em Portugal, onde a população dedica cada vez mais tempo, dinheiro e atenção aos seus animais de estimação, sendo que factores demográficos como o envelhecimento da população também auxiliam em aspectos como um maior número de animais de estimação adoptados em todo o país (AEP,2012).

Em 2009, o mercado *pet care* ultrapassou os 230 milhões de euros em Portugal, sendo também objecto de realce que o mercado de *pet food* manteve, nos últimos anos, uma tendência de crescimento apesar da grande oferta já existente (AEP, 2012).

O segmento de alimentos para cães é a principal categoria *pet food*, com o valor de vendas, em 2009, de aproximadamente 65,5 milhões de euros em Portugal, enquanto o segmento de alimentos para gatos de 50,4 milhões (AEP, 2012).

Em termos de prospecções futuras, espera-se que as vendas *pet care* e *pet food* em Portugal continuem a aumentar apesar da crise económica que se atravessa, onde a existência de alguns fatores pode explicar o contínuo aumento de valor deste mercado. Uma maior sensibilização para o não abandono dos animais de estimação, assim como para a melhoria de hábitos de alimentação e saúde dos mesmos e o consequente desenvolvimento de novos produtos neste ramo contribuem para um alargamento no consumo potenciando um crescimento nesta área de negócio. No entanto, apesar desta evolução, muitos aspectos ainda permanecem desconhecidos na nutrição de cães e gatos, sendo necessário alguns estudos a nível de caracterização físico-química, efeitos de processo, biodisponibilidade e respostas metabólicas dos ingredientes utilizados pela indústria (AEP, 2012; Carciofi e Jeremias, 2010).

Devido a todos estes fatores, existe assim um potencial interessante para os segmentos emergentes como é o caso dos produtos nutricionais *premium*, num mercado com tendência a evoluir positivamente, no qual se podem contar com diversas empresas/fabricantes em Portugal.



## 1.2 Ovargado, S.A.

Inserido no âmbito do estágio curricular relativo ao Mestrado em Biotecnologia na Universidade de Aveiro surge então a Ovargado, S.A. Uma empresa que fabrica, investiga e desenvolve novos produtos no ramo de alimentos para animais.

A Ovargado S.A. é uma empresa com décadas de experiência na área dos alimentos para animais. Situada na cidade de Ovar, conta já com mais de 30 anos de experiência no sector agro-alimentar.

É constituída hoje em dia por três diferentes unidades:

- A Unidade de Rações, onde são fabricados alimentos compostos, mistura de cereais e subprodutos para alimento de animais de exploração;
- A unidade de *pet foods*, onde são fabricados alimentos compostos para animais de companhia (cães, gatos, pássaros e roedores);
- A Petplanet, uma área comercial com milhares de produtos em armazém relacionados com as áreas *pet food*, pecuária e horta-jardim para a venda a público e revenda.

A Ovargado é, hoje, a única empresa portuguesa capaz de produzir alimentos farinados, granulados, extrusados e multi-particulados para todas as espécies zootécnicas terrestres.

A Ovargado fabrica/transforma diariamente mais de 250 toneladas de alimentos para animais, recebendo diariamente centenas de toneladas de diferentes matérias-primas para sustentar esta produção. No caso da produção de *pet food*, esta empresa tem como base um conjunto de matérias-primas que utiliza na produção dos seus produtos:

- Cereais como: milho ou sêmea de trigo;
- Farinhas de carne;
- Farinhas de aves ou penas;
- Farinha de peixe;
- Farinha de sangue;
- Alfarroba e polpa de beterraba;
- Gordura animal de aves;
- Proteína hidrolisada;

- Aditivos Nutritivos: vitaminas, minerais, aminoácidos;
- Aditivos Tecnológicos: conservantes, antioxidantes;
- Aditivos Organoléticos: corantes, aromas;

### 1.3 Segmentos de *Pet Food*

Tanto a categoria de fabrico de alimento para cães como para gatos apresentam taxas de crescimento elevadas, situação que faz com que os mesmos apresentem um elevado potencial de crescimento. Actualmente o “mercado de *pet food*” divide-se em três segmentos:

#### ▪ **Rações secas:**

Representam a maioria do segmento de *pet food* mundial, facto que pode ser explicado devido à sua facilidade de armazenamento, administração simples e prática. Para além destes aspectos, é de salientar o baixo custo deste tipo de produto, uma tecnologia de fabrico que usa temperaturas elevadas funcionando como um processo de pasteurização para o produto, um teor de água baixo e uma atividade de água também pequena o que previne crescimento microbiológico como será explicado posteriormente. Com teores de humidade a rondar os 8-10% , a ração seca possui boa conservação, sofrendo poucas alterações após a abertura da embalagem, sendo que em média o prazo de validade típico para este tipo de rações se estende até um ano (Zicker, 2008).

#### ▪ **Rações semi-húmidas:**

Este tipo de rações representa uma pequena, porém significativa porção do mercado de *pet food* industrializado e requerem já a adição de substâncias que controlem o nível de humidade do produto, como a glicerina.

O modo de produção destas rações também é baseado na extrusão, mas requer o uso de temperaturas e pressões menores do que as usadas nas rações secas, fazendo com que o produto tenha assim uma humidade superior (entre 25 a 35%) (Zicker, 2008);

### ▪ Rações húmidas (ou enlatadas):

As rações húmidas ou enlatadas representam um grande segmento dos alimentos industrializados para animais domésticos e necessitam da presença de agentes gelificantes ou espessantes para adquirirem a sua consistência final (são utilizados produtos como amido). Este tipo de produto possui um alto teor de carne, quando comparados com as rações secas (Zicker, 2008). As principais vantagens deste tipo de produto são a alta durabilidade do mesmo quando devidamente selado e um sabor mais agradável ao paladar, quando comparadas às rações secas. No entanto, este tipo de ração pode ser mais dispendioso e requer mais cuidados após a abertura, muito devido à susceptibilidade a ataques e crescimento por fungos e bactérias causado pelo alto teor de humidade do produto, apresentando uma validade curta depois de o produto estar aberto, de um a dois dias (Zicker, 2008).



**Figura 1** – Aspecto visual de um tipo de ração seca (cima, lado esquerdo), um tipo de ração húmida (cima, lado direito e um tipo de ração semi-húmida (baixo))

(Fonte: Estrela-Animal, 2016, Texture Technologies, 2016 e HRS4pets, 2016)

A principal diferença entre elas é o conteúdo de humidade, sendo que a ração seca contém uma quantidade de água menor que 11% com uma actividade da água de 0,46; as semi-húmidas possuem de 25 a 35% de humidade e 0,8 de actividade da água e as húmidas de 60 a 87%, com uma actividade da água a rondar valores como 0,99 (Zicker, 2008).

Estes segmentos subdividem-se em gamas de preços habitualmente designadas por: económica, média, *premium* e *super premium*. Os subsegmentos designados de económico e médio referem-se a produtos utilizados diariamente na produção de alimentos para animais, de formulação variável e dependente da disponibilidade das matéria-primas no mercado. Geralmente contém apenas ingredientes base como milho, farinha de trigo, ou farinhas de carne e osso com teores de proteína ou gordura mais reduzidos para uma alimentação média, designada de manutenção (França, 2009). O subsegmento *premium*, difere no sentido de possuir uma maior qualidade a nível nutricional, através da seleção de matérias-primas mais enriquecidas, possivelmente, alguma inovação com ingredientes diferenciados e nutracêuticos (França, 2009). O alimento *super premium*, surge como um conceito mais inovador, de elevada qualidade, incorporando nutrientes que enriquecem a ração e que respondem a objectivos nutricionalmente mais ambiciosos do que apenas corresponder às necessidades do animal, com as concentrações nutricionais a viabilizar uma optimização da saúde do animal (França, 2009).

## **1.4 Matérias-Primas e Necessidades Nutricionais**

Com o objetivo de ir ao encontro das necessidades nutricionais dos animais, os produtos por estes consumidos têm como base matérias-primas e aditivos que forneçam todos as espécies de nutrientes que estes necessitem, para assim o produto final poder contribuir para um correcto e saudável crescimento e desenvolvimento do animal e claro está, os ingredientes compõem a base na formulação dos alimentos industrializados. As proporções e tipos de ingredientes utilizados no processo de fabricação precisam ser levados em conta quando o produto final é destinado a cães ou a gatos. Segundo a AAFCO em 2008, foram identificados alguns nutrientes específicos como importantes na nutrição desses animais (Tabelas 2 e 3), divididos pelas seguintes famílias:

**Tabela 2**– Níveis mínimos de nutrientes recomendados para Cães- por 100 gramas de matéria seca (Adaptado de : F.E.D.I.A.F.Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, Janeiro de 2016)

Nutriente	Unidade	Adultos	Crescimento e reprodução
		<b>Mínimo Recomendado</b>	
<b>Proteína</b>	<b>G</b>	<b>18,0</b>	<b>25,0</b>
<b>Arginina</b>	G	0,52	0,82
<b>Histidina</b>	G	0,23	0,39
<b>Isoleucina</b>	G	0,46	0,65
<b>Leucina</b>	G	0,82	1,29
<b>Lisina</b>	G	0,42	0,88
<b>Metionina</b>	G	0,31	0,35
<b>Fenilalanina</b>	G	0,54	0,65
<b>Treonina</b>	G	0,52	0,81
<b>Triptofano</b>	G	0,17	0,23
<b>Valina</b>	G	0,59	0,68
<b>Gordura</b>	<b>G</b>	<b>5,5</b>	<b>8,50</b>
<b>Ácido Linoleico (ω-6)</b>	G	1,32	1,30
<b>Ácido Araquidónico (ω-6)</b>	Mg	-	30,0
<b>Ácido Linolénico (ω-3)</b>	G	-	0,08
<b>EPA + DHA (ω-3)</b>	G	-	0,05
<b>Minerais</b>	-	-	-
<b>Cálcio</b>	G	0,50	1,00
<b>Fósforo</b>	G	0,40	0,90
<b>Potássio</b>	G	0,50	0,44
<b>Sódio</b>	G	0,10	0,22
<b>Cloreto</b>	G	0,15	0,33
<b>Magnésio</b>	G	0,07	0,04
<b>Elementos vestigiais</b>	-	-	-
<b>Cobre</b>	Mg	0,72	1,10
<b>Iodo</b>	Mg	0,11	0,15
<b>Ferro</b>	Mg	3,60	8,80
<b>Manganésio</b>	Mg	0,58	0,56
<b>Selénio</b>	µg	30,0	35,0
<b>Zinco</b>	Mg	7,2	10,0
<b>Vitaminas</b>	-	-	-
<b>Vitamina A</b>	mg	0,15	1,50
<b>Vitamina D</b>	Mg	2,0	2,2
<b>Vitamina E</b>	Mg	2,42	3,4
<b>Vitamina B1</b>	Mg	0,23	0,14
<b>Riboflavina</b>	Mg	0,60	0,53
<b>Vitamina B5</b>	Mg	1,00	1,50
<b>Vitamina B6</b>	Mg	0,15	0,15
<b>Vitamina B12</b>	µg	2,20	3,50
<b>Vitamina B3</b>	Mg	1,10	1,70
<b>Ácido Fólico</b>	µg	18,0	27,0

**Tabela 3**– Níveis mínimos de nutrientes recomendados para Gatos - por 100 gramas de matéria seca (Adaptado de : F.E.D.I.A.F.Nutritional Guidelines for Complete and Complementary Pet Food for Cats and Dogs, Janeiro de 2016)

Nutriente	Unidade	Adultos	Crescimento e reprodução
		<b>Mínimo Recomendado</b>	
<b>Proteína</b>	<b>G</b>	<b>25,0</b>	<b>28,0 / 30,0</b>
<b>Arginina</b>	G	1,00	1,07 / 1,11
<b>Histidina</b>	G	0,30	0,33
<b>Isoleucina</b>	G	0,49	0,54
<b>Leucina</b>	G	1,17	1,28
<b>Lisina</b>	G	0,34	0,85
<b>Metionina</b>	G	0,17	0,44
<b>Fenilalanina</b>	G	0,46	0,50
<b>Treonina</b>	G	0,60	0,65
<b>Triptofano</b>	G	0,15	0,16
<b>Valina</b>	G	0,59	0,64
<b>Taurina</b>	G	0,20	0,25
<b>Gordura</b>	<b>G</b>	<b>9,0</b>	<b>9,0</b>
<b>Ácido linoleico (ω-6)</b>	G	0,50	0,55
<b>Ácido araquidónico (ω-6)</b>	Mg	6,00	20,0
<b>Ácido linolénico (ω-3)</b>	G	-	0,02
<b>EPA + DHA (ω-3)</b>	G	-	0,01
<b>Minerais: Cálcio</b>	G	0,59	1,00
<b>Fósforo</b>	G	0,50	0,84
<b>Potássio</b>	G	0,60	0,60
<b>Sódio</b>	G	0,08	0,16
<b>Cloreto</b>	G	0,11	0,24
<b>Magnésio</b>	G	0,04	0,05
<b>Elementos vestigiais: Cobre</b>	Mg	0,50	1,00
<b>Iodo</b>	Mg	0,05	0,18
<b>Ferro</b>	Mg	8,00	8,00
<b>Manganésio</b>	Mg	0,50	1,00
<b>Selénio</b>	µg	30,0	30,0
<b>Zinco</b>	Mg	7,50	7,50
<b>Vitaminas: Vitamina A</b>	mg	0,09	0,27
<b>Vitamina D</b>	mg	0,006	0,02
<b>Vitamina E</b>	Mg	2,60	2,6
<b>Tiamina</b>	Mg	0,56	0,55
<b>Riboflavina</b>	Mg	0,40	0,40
<b>Vitamina B5</b>	Mg	0,58	0,57
<b>Vitamina B6</b>	Mg	0,25	0,40
<b>Vitamina B12</b>	µg	2,25	2,00
<b>Vitamina B3</b>	Mg	4,00	4,00
<b>Ácido fólico</b>	µg	80,0	80,0
<b>Vitamina B8</b>	µg	7,50	7,00

### **1.4.1 Necessidades Nutricionais**

#### **Proteínas**

Tanto cães como gatos necessitam de aminoácidos essenciais, fornecidos por dieta aos animais, não sendo sintetizados pelo organismo, dos quais por exemplo fazem parte a arginina, histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano ou valina. No entanto, um aminoácido não essencial como a taurina não é sintetizado pelos gatos, pelo que este tem de surgir como forma de suplemento em rações destinadas a este tipo de animal (Case et al.; 2011). A necessidade a nível de proteínas em cães e gatos varia e é baseada na idade do animal, estado de desenvolvimento e saúde. Estas biomoléculas intervêm no crescimento, reprodução e manutenção corporal. É recomendado que os produtos destinados ao consumo de cães e gatos adultos contenham no mínimo de 18 a 22,75% de teor em proteína, enquanto que para cães e gatos em fase de crescimento o teor varie entre 22 e 26,5% de proteína (AAFCO, 2008).

Indo ao encontro dos diferentes objectos de estudo que irão ser apresentados neste trabalho, podemos então destacar algumas fontes de proteína como: farinha de subprodutos de aves (em geral frango); farinha de carne bovina, farinha de carne e ossos bovinos ou farinhas de peixe. Dependendo das fontes proteicas os valores situam-se entre 45-50 % (farinha de carne e ossos) até 85-90% (farinha de sangue) (Thompson, 2008). A proteína destes produtos é altamente digerível, rica em aminoácidos essenciais como a Lisina ou Metionina (Li et al., 2011). Vários estudos, como Murray et al. (1997) confirmam a alta digestibilidade de proteínas provenientes de subprodutos de origem animal como Farinhas de Carne e Osso e Farinhas de Aves com valores a rondar os 88,2% e 89,5% respectivamente.

#### **Hidratos de Carbono e Fibras**

Os hidratos de carbono e as fibras são essenciais durante a fase de crescimento dos animais, momento de desenvolvimento em que necessitam de uma maior dose de energia e surgem nas rações animais através de cereais como milho, trigo e arroz. As fibras são substâncias quimicamente constituídas principalmente por uma mistura heterogénea composta por celulose, hemiceluloses, pectina, gomas, polissacarídeos e

lenhina que no seu conjunto desempenham um papel importante no controlo do trânsito intestinal, absorção de água e formação das fezes (Thompson, 2008).

Entre as principais fontes de hidratos de carbono estão os cereais: grãos inteiros e suas farinhas, como milho, aveia e arroz integral, farinha de trigo, batatas e sorgo.

Relativamente às fontes de fibras, as diversas matérias-primas às quais são possíveis citar como fonte deste nutriente são, por exemplo: sêmea grosseira de trigo, sêmea grosseira de arroz, casca de soja, polpa de beterraba, vagens de alfarroba seca ou inulina (Thompson, 2008).

## **Vitaminas e Minerais**

Reconhecidas como nutrientes essenciais, as vitaminas podem ser definidas como substâncias envolvidas na manutenção das funções corporais. Podem ser divididas em duas classificações: lipossolúveis (A, D, E e K) e hidrossolúveis (C ou B2, entre outras), sendo as lipossolúveis as únicas armazenáveis no fígado, enquanto as hidrossolúveis precisam ser incluídas regularmente na dieta (Case et al., 2011).

Compostos inorgânicos que constituem a maior porção dos dentes, garras e do esqueleto dos animais, onde podemos encontrar quantidades significativas de por exemplo cálcio e fósforo (Murray et al., 1997; Cramer, 2007). Os minerais são necessários para reacções metabólicas no organismo e também para a formação e manutenção do esqueleto de animais (Case et al., 2011). Especificamente, os alimentos destinados a cães e gatos deverão apresentar no mínimo de 1,0% de cálcio e 0,9% de fósforo na sua constituição para animais em fase de crescimento e reprodução e um nível mínimo de 0,5% para o cálcio e 0,4% para a manutenção de animais já desenvolvidos (AAFCO, 2008; Case et al., 2011).

As vitaminas e minerais estão já presentes nas matérias-primas que estão presentes na própria formulação das rações. No entanto, ao sofrerem processamento térmico durante a produção de *pet food* como por exemplo o cozimento, estes tendem a degradar-se, sendo necessária a sua reposição no final da produção. Assim sendo, uma mistura de vitaminas e sais minerais é geralmente aplicada nas rações (Thompson, 2008).

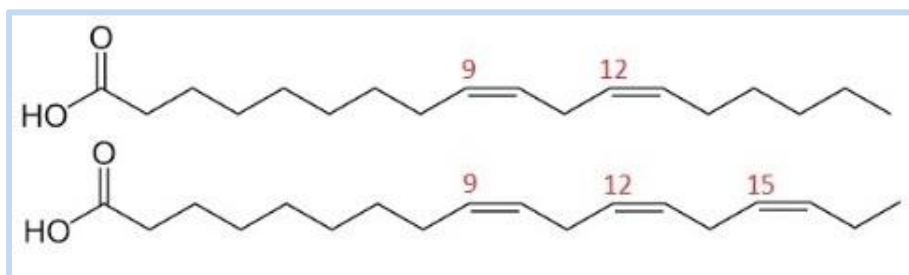


## Lípidos

Na forma de gorduras ou óleos, os lípidos são uma fonte concentrada de energia e ácidos gordos essenciais, encontradas em tecidos animais e vegetais, sendo insolúveis em água, mas solúveis em solventes orgânicos. Algumas fontes lipídicas mais usadas em alimentos para cães e gatos são as gorduras animais, como a gordura de aves, óleos de peixe, manteiga, banha, ovos e também algumas fontes vegetais como óleos e grãos oleaginosos (Gray, 2015).

Uma das principais capacidades dos lípidos é o armazenamento de energia, esta, armazenada sob forma de triglicerídeos é de grande importância para os animais, isto porque a queima de gorduras produz mais do que o dobro da energia (cerca de 9 kcal/g) do que quando comparado com o gasto da mesma quantidade de hidratos de carbono (cerca de 4 kcal/g) devido à extensão da sua oxidação (Gray, 2015).

Outra das importantes funções dos lípidos é fazer parte da constituição das membranas. Visto que grande parte dos constituintes do nosso organismo como as proteínas ou os hidratos de carbono são solúveis em água, este também necessita de componentes insolúveis que separem soluções aquosas, sendo células ou organelos dentro das próprias células, e os lípidos colmatam essa necessidade. A sua insolubilidade provém do facto das suas longas cadeias de átomos de carbono lhes conferirem propriedades hidrofóbicas (Gray, 2015; Case et al., 2011). O ácido linoleico e o ácido linolénico são motivo de destaque, uma vez que são os principais componentes das membranas celulares e precursores de por exemplo respostas inflamatórias (Simopoulos, 2004; Belitz et al., 2009).



**Figura 2** – Imagem representativa do ácido linoleico Ómega 6 (em cima), e do ácido linolénico Ómega 3 (em baixo) (Retirado de: [http://parts.igem.org/Part:BBa\\_K1472611](http://parts.igem.org/Part:BBa_K1472611), Janeiro de 2016)

Os níveis mínimos de gordura estão estabelecidos para os animais em estado de crescimento e reprodução de 8,5% e de 5,5% para cães já adultos. Alguns ácidos gordos

ômega-3 como ácido linolénico, assim como o ácido eicosapentaenóico juntamente com o ácido docosahexaenóico, que estão envolvidos no desenvolvimento do sistema nervoso e visual durante a fase embrionária do animal, têm como limites mínimo como 0,08% para o ácido linolénico e de 0,05% para o ácido eicosapentaenóico e docosahexaenóico (AAFCO, 2008).

A fonte de lípidos adicionados na confeção de *pet food* é principalmente de origem animal por uma questão de palatibilidade. As gorduras adicionais provêm de fontes como: subprodutos bovinos, subprodutos de aves e óleo de soja, óleo de peixe ou óleo de linhaça (Thompson, 2008).

### **Outros ingredientes**

Além dos ingredientes relativos à nutrição, outros podem ser utilizados, tais como: Cloreto de Sódio, conservantes e estabilizantes como o butil hidroxitolueno (BHT) ou butil hidroxianisol (BHA) e até mesmo agentes gelificantes também podem ser necessários para manter a homogeneidade durante o processamento e controlo da humidade, como por exemplo goma de linhaça (Chen et al.; 2006; Thompson, 2008). A qualidade a nível de sabor pode ser melhorada com extractos de leveduras, gorduras, aromas de peixe ou aromatizantes (Thompson, 2008).

#### **1.4.2 Subprodutos de Origem Animal**

Os subprodutos de origem animal são uma grande alternativa a nível de fonte de proteínas na nutrição animal, reduzindo os custos da dieta, uma vez que este tipo de produtos substituem parcial ou totalmente alguns ingredientes de custo mais elevado como por exemplo o bagaço de soja assim como a proteína animal é melhor digerida pelos próprios cães e gatos (Scheuermann, 2007).

Para além destes aspectos, a utilização de proteína animal em rações de animais para consumo humano é proibida e a utilização dos subprodutos como fonte alternativa de proteína para rações eleva o lucro dos matadouros e evita a poluição ambiental, que poderia ser causada caso esses resíduos fossem descartados no meio ambiente (Scapim et al., 2003).

### **1.4.2 Principais subprodutos de origem animal utilizados na produção industrial de *pet food***

De uma forma geral, o processamento das farinhas de origem animal consiste em retirar os excessos de água, através da aplicação de calor seco, picar e/ou triturar os resíduos não comestíveis, seguido de um cozimento com ou sem pressão, por tempo variável. A gordura deve ser drenada, prensada ou centrifugada e o resíduo sólido moído na forma de farinha com especificações de granulometria variáveis (Matias et al., 2012; Bellaver et al., 2005). As farinhas de origem animal mais utilizadas na alimentação animal podem ser agrupadas da seguinte forma:

**Farinha de penas hidrolisadas:** produto resultante da hidrólise ácida sob altas temperaturas, secagem e trituração, sob pressão, de penas limpas e não decompostas, obtidas no abate de aves (Matias et al., 2012).

**Farinha de aves:** produto resultante do aquecimento, prensagem e moagem de vísceras de aves, sendo permitida a inclusão de cabeças e pés. Não deve conter penas, excepto aquelas que podem ocorrer não intencionalmente (Matias et al., 2012; IACA, 2015).

**Farinha de carne e ossos de bovino:** produzido a partir de ossos e tecidos obtidos após a desossa completa da carcaça de bovinos, moídos, cozidos, prensados para extração de gordura e novamente triturados. Não deve conter sangue, cascos, chifres, pêlos ou conteúdo do tracto digestivo (Matias et al., 2012; IACA, 2015);

**Farinha de Ossos:** Produto obtido através da secagem, aquecimento e trituração de ossos de animais terrestres de sangue quente dos quais grande parte da gordura foi extraída ou separada por processos físicos. Não deve conter sangue, cascos, chifres, pêlos ou conteúdo do tracto digestivo (Matias et al., 2012; IACA, 2015);

**Farinha de sangue:** Produto resultante do processo de cozimento e secagem do sangue fresco. A farinha de sangue convencional é produzida de sangue fresco (Matias et al., 2012; IACA, 2015);

**Farinha de peixe:** Produto obtido de peixes inteiros e/ou cortes de peixes de várias espécies, não decomposto, com ou sem extração de óleo, tendo sido seco e moído (IACA, 2015).

**Tabela 4-** Especificações de qualidade de algumas farinhas de origem animal (Adaptado de Butolo, J.E. (2002) usadas como ingredientes na alimentação animal. Janeiro de 2016).

Parâmetros	Unidade	Farinha de penas	Farinha de aves	Farinha de carne e ossos	Farinha de sangue	Farinha de Peixe
Humidade (máx.)	%	8	8	8	10	8
Proteína Bruta (min.)	%	80	58	35	80	59
Gordura (min.)	%	2	10	4,50	2	9
Matéria Mineral (máx.)	%	4	13	44	4,50	10
Acidez (máx.)	mg/g	6	6	6	6	6
Índice Peróxido (máx.)	meq/kg	10	10	10	10	10

Para confecção de produtos de *pet food*, são utilizadas não só as farinhas de origem animal mas também outro tipo de produtos como por exemplo:

**Gordura suína:** É o produto resultante de tecidos adiposos de suínos, extraída a gordura por prensagem ou solvente após o cozimento, filtrada ou não. Não deve conter outros ácidos gordos livres e produtos de gordura a não ser aqueles obtidos pelas boas práticas de abate e produção de banha suína (Butolo, 2002).

**Gordura de aves:** Produto resultante de tecidos adiposos das aves, extraído na forma de óleo por prensagem ou solvente após o cozimento, filtrada ou não. Não deve conter outros ácidos gordos livres e produtos de gordura a não ser aqueles obtidos pelas boas práticas de abate e produção de gordura de aves (Butolo, 2002).

## **1.4.4 Controlo de Qualidade de Matérias-Primas**

### **Receção da matéria-prima**

Às matérias-primas de origem animal, nomeadamente farinhas de origem animal devem ser realizadas análises a nível dos teores de peróxidos e de acidez (estes dois tipos de análise são também aplicáveis a óleos, como o óleo de aves ou de peixe, e gorduras de origem animal), no entanto devido à falta de meios/pessoal é prática comum por parte das fábricas de serem enviadas amostras para laboratórios externos que realizam análises complementares como as referidas previamente. No caso de matérias-primas de origem vegetal são habitualmente determinados os níveis de humidade, actividade da água, aflatoxinas e ausência de contaminantes físicos, químicos e biológicos. As unidades industriais de produção de alimentos compostos para animais realizam então certas análises bromatológicas, habitualmente em equipamentos de espectroscopia de infravermelho próximo (NIR - Near Infra Red) a fim de verificar os níveis de por exemplo, humidade, teor em proteínas, gordura ou fibra.

A nível das farinhas de origem animal, algumas das principais características físicas a serem analisadas são: cor aparente, odor e humidade. Produtos a granel são recebidos e enviados para silos específicos, devidamente controlados, ou seja, ausentes de pragas, fungos e outros contaminantes.

### **Fatores que afectam a conservação dos produtos**

O armazenamento constitui uma prática importante para manutenção da qualidade dos produtos até ao seu consumo. Os cuidados durante esse período estão intrinsecamente relacionados com o tipo de produto armazenado e com as condições de armazenamento, como será explicado posteriormente.

Conhecendo as principais características das matérias-primas utilizadas é necessário controlar fatores físicos como por exemplo a temperatura e humidade que irão afetar o estado de preservação das matérias-primas. Existem diversos fatores que podem influenciar a qualidade das farinhas de origem animal, dos quais são merecedores de destaque alguns de maior importância como:

- **Humidade:**

A humidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar várias características do produto durante por exemplo o armazenamento: alimentos armazenados que possuam um alto teor de humidade irão deteriorar mais rapidamente comparativamente aos que possuem baixa humidade. Por exemplo, nos cereais utilizados para confecção de *pet food*, os grãos estão sujeitos a rápida deterioração devido ao crescimento de fungos que desenvolvem toxinas como aflatoxina (Belitz et al.; 2009).

Processos como o desenvolvimento de fungos, leveduras ou bactérias têm como um dos fatores mais decisivos para o seu desenvolvimento a elevada atividade de água dos produtos (Belitz et al.; 2009). A atividade da água (*aw*) é também um dos critérios cada vez mais utilizados a nível de segurança e qualidade alimentar, pois os microorganismos têm um limite mínimo de *aw* no qual se podem desenvolver nos alimentos. A atividade da água determina o limite mínimo para o crescimento microbiano, ou seja, um valor de atividade da água para o crescimento de bactérias patogénicas como a *E.coli* é de no mínimo 0,9 enquanto que para bolores como *Aspergillus niger* o limite é menor, atingindo um valor de 0,70 assim como as leveduras. O limite mínimo para a generalidade dos microorganismo é de 0,60 (Beuchat, 1983).

- **Contaminações:**

Contaminações por cascos, chifres, sangue, pelos, sal, resíduos estomacais ou intestinais ou penas devem ser minimizadas em função da definição de cada produto produzido e manutenção dos padrões de qualidade, ou seja, de acordo com os seus limites definidos (Butolo, 2002).

- **Oxigénio:**

Como as farinhas de origem animal são ricas em gorduras suscetíveis de sofrerem auto-oxidação pela presença de oxigénio levando à formação de radicais livres. Fatores como temperatura, presença de enzimas, luz, e iões metálicos podem influenciar a formação de radicais livres. Portanto, é importante impedir o início da formação de

radicais livres, que poderá ser feito pelo manuseamento adequado durante a fase de produção e armazenamento como evitar a exposição do produto ao oxigénio, à luz ou a altas temperaturas (fatores que afectam a oxidação e consequentemente danificam os produtos). Substâncias antioxidantes naturais e sintéticas podem ser incorporadas para diminuir a auto-oxidação dos ácidos gordos das farinhas (Matias et al., 2012). O fenómeno da oxidação ocorrerá em maior escala quanto maior for a exposição/contacto entre o produto (tanto produto final como matéria prima) e o oxigénio (Talbot, 2016).

A exposição tanto de matérias-primas como de produto final durante o armazenamento é de facto um dos pontos a ter em conta em relação ao controlo de qualidade de um produto. Segundo Tsutzuki et al (2014), uma maior exposição ao oxigénio influenciará negativamente produtos como farinha de trigo (uma das matérias-primas base na produção de *pet food*), em que aumentou o nível de oxidação ao longo de 8 semanas quando este tipo de produto não é protegido do contacto com oxigénio comparando com amostras que foram protegidas. Mostrando que amostras de farinha de trigo mais expostas ao oxigénio, têm uma velocidade de oxidação superior.

- **Temperatura:**

Segundo Talbot (2016), a velocidade de oxidação em óleos ou gorduras duplica a cada aumento de 10°C de temperatura. É por isso importante garantir que não ocorram ou exista possibilidade de ocorrer oscilações de temperaturas que possam facilitar esse processo. A nível industrial é recomendado que o armazenamento de por exemplo gorduras animais seja feito por volta dos 45-50 °C de temperatura, pois temperaturas mais baixas neste tipo de produtos, apesar da probabilidade de uma menor velocidade de oxidação, poderão aumentar o risco de cristalização dos triglicerídeos em produtos como gordura de aves.

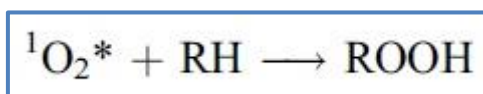
O aumento de temperatura não só terá influência a nível da oxidação mas também a nível da libertação de ácidos gordos durante o armazenamento. Estudos como o de Tsuzuki et al. (2014) revelaram que matérias-primas como farinha de trigo irão sofrer de uma forma mais acentuada processos de hidrólise libertando ácidos gordos se armazenados a temperaturas mais elevadas. Comparando os resultados, chegou-se à conclusão que um armazenamento a 26 °C durante oito semanas mostrou sensivelmente o dobro do conteúdo em ácidos gordos livres quando comparado com amostras

armazenadas a 4 °C. Altas temperaturas irão então promover a actividade de enzimas hidrolíticas, sugerindo que a temperatura de armazenamento é um dos fatores a ter em conta na preservação de produtos.

Comparativamente a outros estudos realizados que envolvam avaliação de estabilidade oxidativa de produto final destinado a alimentação animal, um dos que mais se aproxima das condições de realização deste trabalho é o estudo de Gross et al. (2013), em que foi testada a conservação de alimentos secos destinado a cães pela ação de Etoxiquina e BHA a diferentes temperaturas durante 60 semanas. Tanto na situação de armazenamento a altas temperaturas (48,8 °C) como a temperatura ambiente (22,2 °C) os produtos permaneceram também dentro dos limites aceitáveis.

- **Luz:**

Fatores como incidência de luz podem também interferir na qualidade tanto de produtos finais como de matérias-primas, onde os metais Ferro ou Cobre ou algumas moléculas como a mioglobina são responsáveis por este processo. Existem dois tipos de oxidação promovidos pela incidência de luz, em que o tipo I se caracteriza pela transferência do átomo de hidrogénio, produzindo radicais livres, prosseguindo assim o fenómeno da auto-oxidação, enquanto que o tipo II é baseado na reação direta com o singlete de oxigénio (espécie eletronicamente excitada, neste caso ocorre pela incidência de luz na molécula de oxigénio), sendo esta molécula muito reativa, irá formar posteriormente hidroperóxidos pela sua reação com as duplas ligações das cadeias de ácidos gordos (Talbot, 2016).



**Figura 3-** Formação de hidroperóxido por reação de singlete de oxigénio (Retirado de Talbot, 2016);

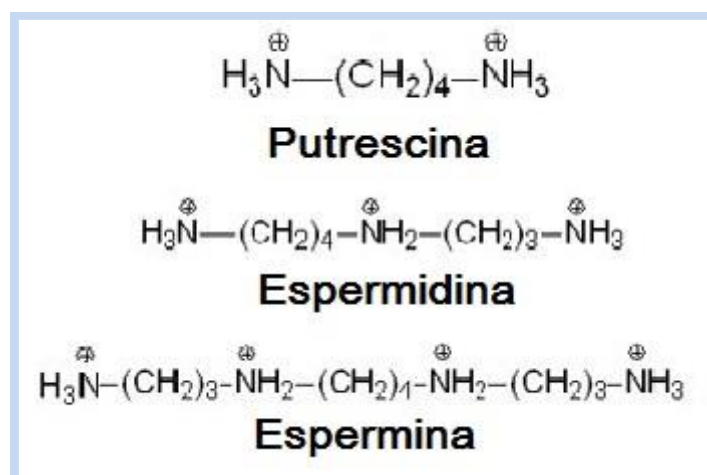
- **Poliaminas (Aminas biogénicas):**

Várias poliaminas como a putrescina, espermidina e espermina ou cadaverina estão presentes em diferentes concentrações nos alimentos vegetais e animais. Estas surgem como resultados de descarboxilação de certos aminoácidos como a lisina ou ornitina dando origem à cadaverina e putrescina respectivamente. O processo de formação das aminas biogénicas inicia-se com a degradação de proteínas, libertando aminoácidos que por sua vez sofrem descarboxilação por ação enzimática por



aminod Descarboxilases (Belitz et al.; 2009). A espermina, foi considerada tóxica quando administrada a um nível de 0,2%, enquanto que a espermidina também é tóxica para frangos a partir de 0,4%. A toxicidade aumenta com o aumento do peso molecular e carga das aminas biogénicas. O efeito depressivo no crescimento dos animais devido à presença de aminas biogénicas é dependente do peso molecular e da carga catiónica (Sousadias e Smith, 1995).

A absorção das poliaminas no intestino é dependente das enzimas catabólicas presentes no tecido intestinal no entanto, têm sido apontadas como substâncias que causam toxicose quando ingeridas pelos animais (Bardócz et al., 1993). O método existente para o controlo destas aminas biogénicas em alimentos é a refrigeração, no entanto, é actualmente conjugado este método com outros como por exemplo a alta pressão ou irradiação. Estes métodos actuam pela inibição da actividade da enzima descarboxilase responsável pela produção das aminas (Naila et al.; 2010).



**Figura 4**— Estrutura de diferente poliaminas (Adaptado de: [themedicalbiochemistrypage.org](http://themedicalbiochemistrypage.org); Janeiro de 2016)

## 1.5 Processos de degradação de lípidos

### 1.5.1 Oxidação lipídica

A oxidação de lípidos é um grave problema que ocorre na indústria de alimentos, devido à rancificação destes pela produção de compostos como derivados da decomposição de hidroperóxidos, como álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e outros hidrocarbonetos. Estes compostos promovem alterações sensoriais e intervêm na destruição de constituintes essenciais, levando a uma diminuição do valor nutricional do

alimento e formação de compostos tóxicos durante o processamento e armazenagem do produto (Milani et al., 2010). As reações oxidativas de ácidos gordos dão origem a uma série de consequências adversas como a formação de aldeídos e outros compostos voláteis já referidos que conferem odores desagradáveis a diversos tipos de carnes e derivados, que, após dias de armazenagem, apresentam um aroma (ranço) ou um sabor desagradável (Tims e Watts, 1958).

A oxidação lipídica promove também a modificação de algumas características de alguns alimentos como por exemplo: cor de carnes, pela transformação do pigmento oximioglobina, de coloração vermelho brilhante, em metamioglobina, tornando a carne acinzentada. A oxidação de gorduras também altera a textura de carnes, isto acontece quando lípidos oxidados e produtos da oxidação lipídica formam complexos proteína-lípido via radicalar e provocam uma quebra entre proteínas (Belitz et al.; 2009; Kanner, 1994; Morey et al., 1973).

De maneira geral, os alimentos para cães e gatos contêm alta quantidade de fontes lipídicas, compostas por uma variedade de ácidos gordos que se diferenciam quanto a propriedades químicas, físicas e quanto à sua capacidade de oxidação, como a gordura animal que se caracteriza por ser saturada, tornando-se menos susceptível à oxidação do que gorduras insaturadas (Osawa et al., 2008).

A oxidação de lípidos tem um grande impacto económico na indústria *pet food*, não só porque pode alterar as características organolépticas como o odor e sabor do alimento, diminuir a vida de prateleira e alterar a textura e aparência dos alimentos, mas também porque pode diminuir a qualidade e segurança nutricional de alimentos (Silva et al., 1999).

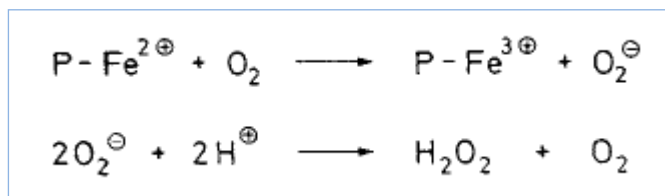
Sendo a oxidação da gordura, um fenómeno espontâneo, é também um processo complexo e envolve diversas reações (Silva et al., 1999). Segundo Osawa et al. (2008) a taxa de oxidação é influenciada por diversos fatores como:

- Composição de ácidos gordos;
- Grau de insaturação da gordura;
- Presença e atividade de pró-oxidantes e antioxidantes;
- Pressão parcial do oxigénio;
- Condições de armazenamento dos alimentos, tais como temperatura e exposição à luz e humidade;

As farinhas de origem animal são ricas em gorduras e por conseguinte têm maior facilidade em se auto-oxidarem, pelo início da formação de radicais livres. Fatores como temperatura, presença de enzimas, luz e iões metálicos podem influenciar a formação de radicais livres (Chow e Tatum, 2008).

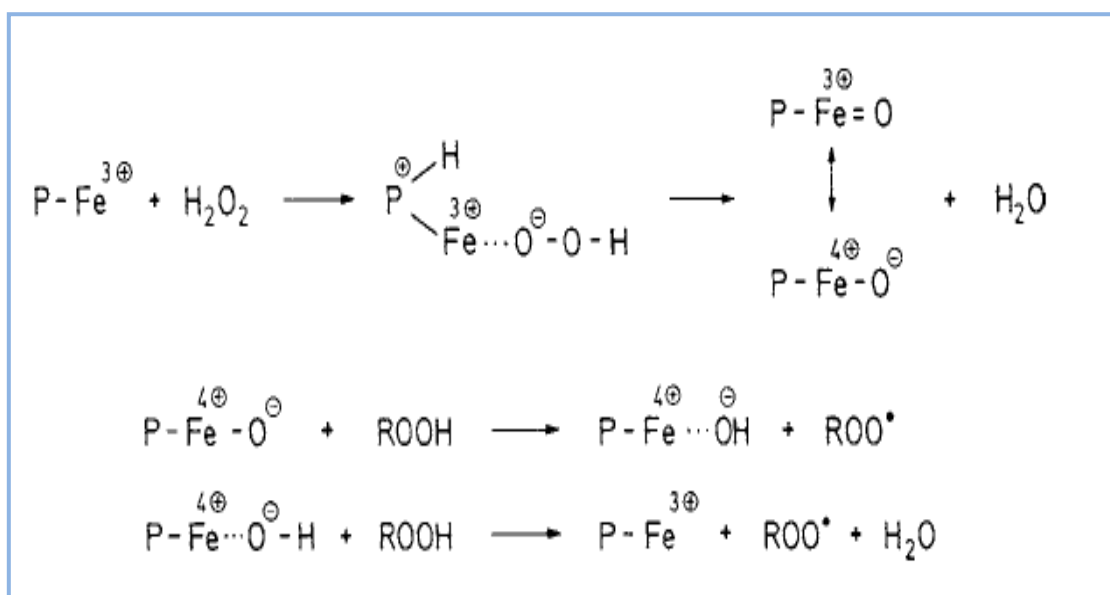
O processo mais comum que conduz à deterioração oxidativa dos lípidos é a sua reacção espontânea com oxigénio, chamado de auto-oxidação (Gordon et al., 2001). Os metais de transição, tais como ferro ou cobre, ajudam no processo de oxidação, facilitando a transferência de electrões que conduz ao aumento da formação de radicais livres (Chow e Tatum, 2008; Gordon et al., 2001; Ladikos et al., 1990).

Subprodutos como a farinha de sangue ou farinhas de peixe são dos produtos mais susceptíveis a sofrerem este tipo de oxidação. Estas caracterizam-se por terem elevados teores em proteína, o que vai contribuir para uma aceleração da oxidação dos mesmos, pela presença do grupo heme, que contém um átomo de ferro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) e durante a catálise do grupo heme, o complexo porfirina-  $\text{Fe}^{2+}$  ( $\text{P-Fe}^{2+}$ ) é oxidado pelo oxigénio para  $\text{P-Fe}^{3+}$  (Figura 5).



**Figura 5-** Oxidação do complexo ( $\text{P-Fe}^{2+}$ ) e formação de hidroperóxidos pelos radicais originados no processo. Retirado de Belitz et al. (2009)

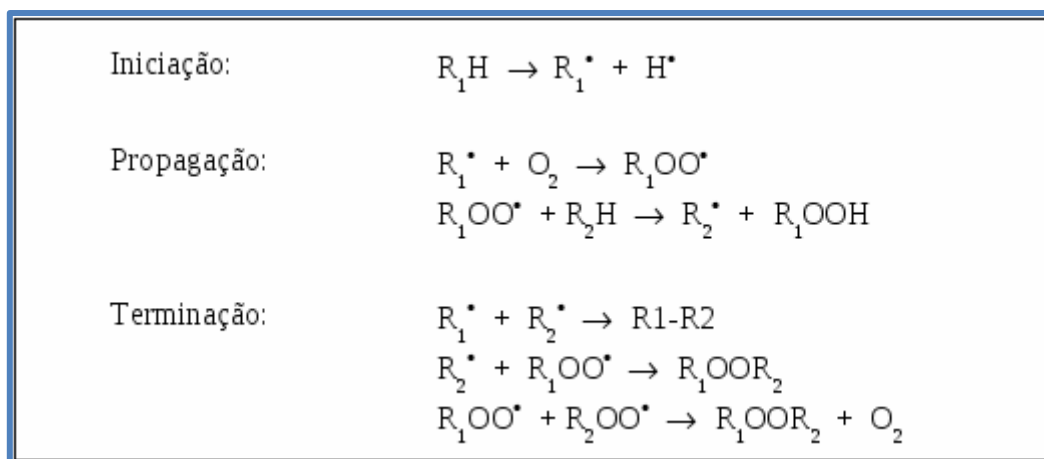
O radical  $\text{O}_2^{\ominus}$  formado durante o processo vai então acabar por reagir e formar  $\text{H}_2\text{O}_2$  que vai oxidar o complexo  $\text{P-Fe}^{3+}$  em espécies do tipo oxeno ( $\text{P-Fe=O}$ ), que por sua vez oxida duas moléculas de hidroperóxido em radicais peroxil, que iniciarão a peroxidação lipídica, revelando assim que o teor elevado de proteína poderá ter também interferência num aumento de valor de peroxidação, como acontece com as farinhas de peixe.



**Figura 6** - Formação de espécies do tipo oxeno e posteriores oxidações, formando radicais que iniciarão a oxidação lipídica. Retirado de Beltz et al. (2009)

As lipoxigenases ocorrem naturalmente e são enzimas que estão presentes em ambos os tecidos de plantas e animais que podem conferir sabores positivos, mas também podem contribuir negativamente para a deterioração oxidativa (Chow e Tatum, 2008; Gordon et al., 2001). Os tipos de gorduras que são mais susceptíveis ao processo de auto-oxidação são as que contêm ácidos gordos insaturados ou poli-insaturados devido ao aumento do número de ligações duplas (Gray, 2015). Por exemplo a nível de subprodutos de animais, a farinha de aves contém mais gorduras insaturadas do que as farinhas de carne e de ossos e teoricamente isso faz com que a farinha de aves seja mais susceptível à oxidação em relação à farinha de carne e ossos (Leeson et al., 2005).

O processo de auto-oxidação destas gorduras pode ser dividido em três fases: iniciação, propagação e terminação (Catala, 2006).



**Figura 7** – As três fases da oxidação lipídica de ácidos gordos insaturados (Melo & Guerra, 2002)

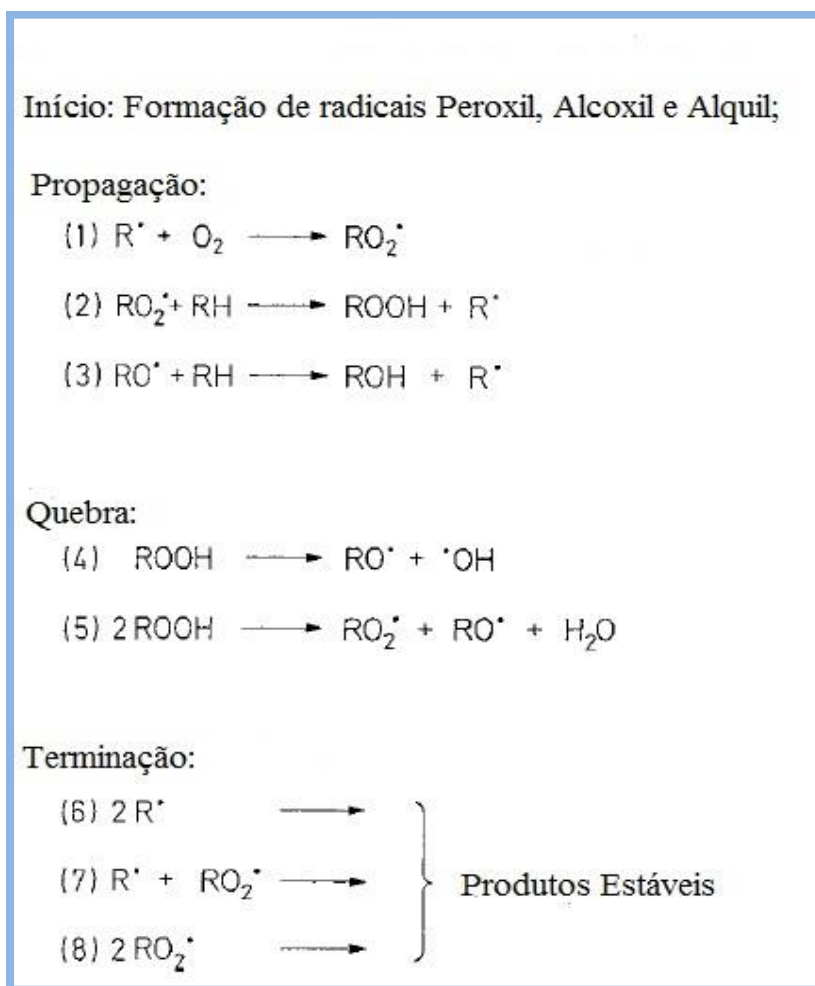
A fase de iniciação de auto-oxidação consiste numa reação relativamente lenta, onde um átomo de hidrogénio é separado homoliticamente do carbono envolvido na ligação dupla, resultando um radical livre. Por sua vez o radical livre reage com o oxigénio para formar um radical peróxido (Catala, 2010; Akoh et al., 2008). Os radicais livres são fortes iniciadores de oxidação e tornam-se autocatalíticos neste processo (Gray, 2015).

As ligações duplas nas gorduras insaturadas e poli-insaturadas “enfraquecem” as ligações simples de carbono-hidrogénio a partir do átomo de carbono adjacente, ou seja, deslocalizam os electrões destas ligações auxiliando assim na “captação” do hidrogénio do carbono (Figura 7- Reação de Iniciação) à ligação dupla *cis* do ácido gordo insaturado, resultando na formação de radicais alílicos. (Catala, 2010).

De acordo com a Figura 7, o radical livre em contato com oxigénio molecular forma um peróxido que, em reação com outra molécula oxidável, induz a formação de um hidroperóxido e outro radical livre. Os hidroperóxidos dão origem a dois radicais livres, capazes de atacar outras moléculas e formar mais radicais livres (Chow e Tatum, 2008).

Após a inicialização, ocorrem as reações de propagação (Figura 8), nas quais um radical lipídico é convertido em um radical lipídico diferente. Estas reacções geralmente envolvem a eliminação de um átomo de hidrogénio de uma molécula lipídica ou a adição de oxigénio para outro radical (Akoh et al., 2008; Gordon, 2004). Mais especificamente, um radical peróxido remove lentamente um átomo de hidrogénio a partir de uma molécula adjacente e forma um radical livre e um hidroperóxido (Akoh

et al., 2008; Denisov et al., 2005). A entalpia da reacção é relativamente baixa, quando comparada com a das reacções de inicialização, ou seja, as reacções de propagação ocorrem rapidamente em comparação com as reacções de inicialização (Gray, 2015).



**Figura 8** – Passos da autooxidação lipídica. Adaptado de Belitz et al. (2009)

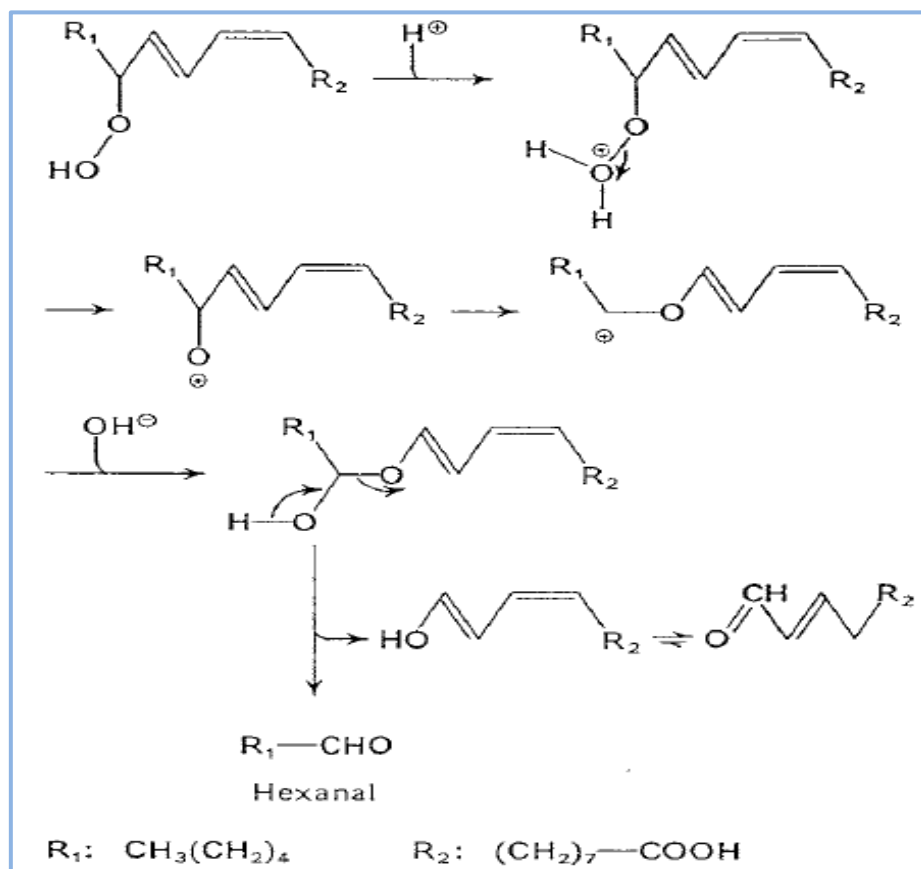
A concentração de hidroperóxidos aumenta com o tempo, estes são produtos primários de auto-oxidação, mas são insípidos e inodoros e, portanto, não vão prejudicar directamente a qualidade dos alimentos (Shahidi, 2005; Chow e Tatum, 2008).

São os produtos secundários, como aldeídos ou cetonas ou a uma maior degradação dos produtos de oxidação primários os responsáveis pelo desenvolvimento da rancificação do produto (Akoh et al., 2008).

Os radicais continuam a reagir pela clivagem de ligações carbono-carbono que formam produtos de oxidação secundários, dando origem a aldeídos, cetonas, álcoois, hidrocarbonetos, ácidos orgânicos voláteis. Segundo Koppel et al. (2013), de entre todos estes produtos secundários, os aldeídos são o grupo de compostos voláteis mais

abundante encontrados em *pet food* e são também estes que são associados na análise sensorial com o descritor de rançoso.

Têm sido sugeridos alguns mecanismos que explicam a formação de compostos voláteis, no entanto, o mecanismo mais provável é  $\beta$ -dissociação de hidroperóxidos com formação de um radical alcóxido, um intermediário reactivo de curta duração. Esta dissociação é catalisada por metais como o ferro ou grupos heme presentes. O mecanismo desta reacção envolve então uma clivagem no carbono adjacente ao hidroperóxido e dá-se na ligação C-C localizada o mais afastado da dupla ligação, que é energeticamente preferível, visto que leva a uma conformação mais estável do produto final.



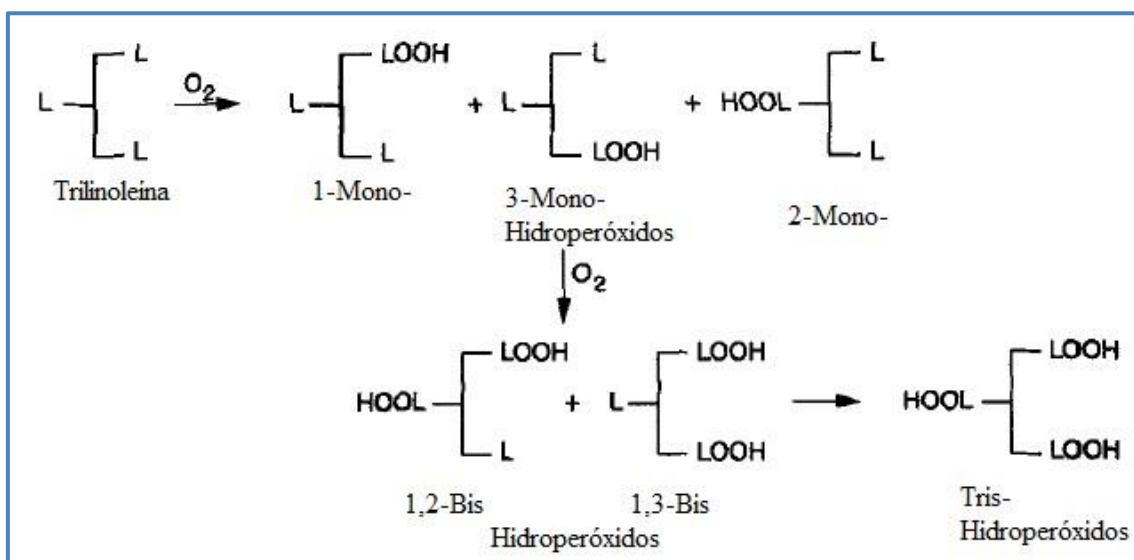
**Figura 9-** Mecanismo da clivagem de um hidroperóxido, com Hexanal como produto final.

(Retirado de: Belitz et al.; 2009)

Um produto secundário como o hexanal, normalmente é formado em quantidades relativamente grandes durante a oxidação de lipídios, através de hidroperóxidos, embora não seja um dos aldeídos aos quais o paladar é mais sensível (Shahidi e Pegg, 1994). O

mecanismo não enzimático da formação do composto secundário hexanal é ainda uma questão em aberto, no entanto, a formação em sistemas aquosos deste composto é sugerida pela protonação do hidroperóxido. De seguida, após a eliminação de uma molécula de água, o catião formado é sujeito a uma reacção de inserção, que se dá unicamente na ligação C-C adjacente à dupla ligação. Pela figura 9, é possível observar que o produto resultante desta inserção sofre depois uma clivagem, transformando-se num oxo-ácido e também em hexanal (Shaidi e Pegg, 1994).

A Trilinoleína tem sido usada como modelo para a oxidação de triglicerídeos (Frankel *et al*, 1990). Os principais produtos da autooxidação da trilinoleína são identificados como mono-, bis- e tris-hidroperóxidos, que são formados sequencialmente por adição de oxigénio. Os mono-hidroperóxidos ao serem oxidados, produzem uma mistura de 1,3- e 1,2 bis-hidroperóxidos que por sua vez são oxidados a tris-hidroperóxidos (Figura 10) (Frankel, 1991).



**Figura 10-** Mecanismo de autooxidação da Trilinoleína; (Adaptado de: Frankel, 1990)

### 1.5.2 Oxidação hidrolítica de lípidos

A libertação de ácidos gordos relaciona-se geralmente com o teor de Ácidos Gordos Livres, ou pelo Índice de Acidez. Esta poderá ser causada pela hidrólise da ligação éster por lipases (enzimas que hidrolisam ésteres de cadeias longas de ácidos ligados a gliceróis (Kwon e Brown, 1984)) na presença de água, formando-se ácidos gordos



livres, saturados e insaturados. Este tipo de processo diminui a qualidade dos produtos como gorduras, alterando especialmente as características organoléticas, como a cor, o odor e o sabor dos alimentos, provocando um aumento de acidez pela presença de ácidos gordos livres provenientes da hidrólise de gordura de farinhas de subproduto de origem animal, fontes de lípidos ou até produtos finais, mesmo após o processo de extrusão ao qual tanto as matérias-primas como os produtos finais estão sujeitos (Belitz et al.; 2009).

Enzimas como as lipases que participam na hidrólise de ácidos gordos não provêm apenas das farinhas de subproduto de origem animal mas também de outras fontes utilizadas na produção de rações *pet food* como algumas matérias-primas de origem vegetal, tendo como exemplo o milho que representa uma grande percentagem (cerca de 50%) na constituição destas rações. Apesar de todas estas matérias sofrerem processos térmicos agressivos, ainda demonstram atividade a nível da hidrólise, dando origem a ácidos gordos livres. Este fenómeno já foi demonstrado em alguns estudos em que mesmo após tratamentos térmicos o conteúdo em ácidos gordos livres em farelo de arroz foi ainda elevado ao fim de 24 semanas de armazenamento a temperatura ambiente. Apesar do tratamento térmico (80°C) ter a capacidade de retrainir de certa forma a percentagem de ácidos gordos livres, não elimina totalmente essa capacidade (Kim et al., 2014). Mesmo após um processo de extrusão a 135°C, existindo um retardamento do processo da hidrólise dos ácidos gordos, este é um fenómeno sempre a ter em conta (Mujahid et al., 2005).

A presença de água acelera o processo de libertação de ácidos gordos e para além disso, quando as gorduras contendo ácidos gordos livres são emulsionadas em água, estes ácidos gordos livres, mesmo em baixas concentrações, proporcionam odor desagradável (Belitz et al.; 2009)

Um elevado índice de acidez indica, portanto, que o óleo ou gordura está a sofrer quebras nas suas cadeias, libertando seus constituintes principais: os ácidos gordos. E é por esse motivo que a determinação do índice de acidez é de extrema importância na avaliação do estado de deterioração (rancificação hidrolítica) da gordura (Belitz et al.; 2009).

### 1.5.3 Métodos de Avaliação de Oxidação Lipídica

Existe uma grande diversidade de métodos analíticos (químicos, físicos e/ou físico-químicos) para a avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante, no entanto na prática existem algumas dificuldades de selecção do método mais apropriado para cada situação. Estão descritos dezenas de métodos diferentes para a avaliação da estabilidade oxidativa de óleos e gorduras. Porém, nenhum método se correlaciona de um modo perfeito com as modificações organolépticas produzidas no decurso das reacções de oxidação. Os métodos podem então ser seleccionados com base na precisão da sua medição, ou seja, como por exemplo a perda de substratos iniciais, a absorção de oxigénio, formação de radicais livres, ou a formação de produtos de oxidação primária e secundária. Sendo assim cada método fornece informações sobre um estado particular do processo oxidativo, variável em função das condições aplicadas e dos substratos lipídicos usados (Gray, 2015; Shahidi et al., 2002).

Existem diversos métodos de análise e parâmetros que as indústrias de rações e alimentos para animais de estimação podem utilizar a fim de medirem a oxidação primária e secundária de alimentos compostos para animais. Seja através de alguns parâmetros como o índice de peróxidos (explicado no capítulo seguinte), o teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA), ou o índice de *p*-anisidina, assim como alguns métodos que podem ser utilizados para análise como a bomba de oxigénio ou cromatografia em fase gasosa (Gray, 2015).

O teste do ácido 2-tiobarbitúrico (TBA) mede os níveis de malonaldeído, um produto secundário da oxidação de lípidos. Neste teste, a amostra será destilada e uma alíquota dessa amostra misturada com reagente TBA e posteriormente aquecida. A reacção do malonaldeído com o TBA resultará num composto cor-de-rosa que será lido posteriormente num espectrofotómetro a 530 nm cujo resultado será convertido em miligramas de malonaldeído por quilograma da amostra (O' Keefe et al., 2010). Quando o teor de malonaldeído é baixo, outros aldeídos não provenientes do processo de degradação dos lípidos podem reagir com o TBA (Hamilton et al.; 1983).

A *p*-anisidina, em meio acético, forma um complexo de cor amarela com os aldeídos que possuem duas duplas ligações conjugadas, em particular com o trans,trans-2,4-decadienal resultante da degradação do ácido linoleico. O índice de *p*-anisidina define-se como 100 vezes o valor da absorvência, medida a 350 nm, de uma solução

resultante da reação de 1 g de gordura em 100 ml de solvente contendo *p*-anisidina (AOCS, 2004; Hamilton et al.; 1983).

No método utilizando uma bomba de oxigénio a amostra é colocada numa bomba de aço inoxidável, na qual o processo oxidativo é acelerado pelo oxigénio sob pressão (65-110 psi O<sub>2</sub>) e pelo aquecimento (99°C). Como resultado da absorção de oxigénio, a pressão no interior da bomba diminui, permitindo desta forma medir o tempo necessário que a amostra leva a absorver o oxigénio, medindo desta forma a estabilidade da amostra (O' Keefe et al., 2010).

Em relação à cromatografia em fase gasosa, esta é usada para quantificar compostos voláteis tais como aldeídos, cetonas, álcoois, ácidos, ésteres, compostos sulfúricos pirazinas, furanos, alcanos, terpenos e derivados de benzeno (Boskou e Elmadfa, 2010). Os aldeídos como já referido em capítulos anteriores, são os produtos de decomposição mais importantes, devido à sua abundância e contribuição significativa para o sabor e odor dos alimentos (Boskou e Elmadfa, 2010). Os aldeídos voláteis mais comuns são aqueles que contêm entre 3 a 10 carbonos, como o propanal, butanal, pentanal, hexanal, entre outros. A análise por cromatografia gasosa é geralmente acompanhada por uma microextração de fase sólida (SPME), que consiste na utilização de fibra de sílica fundida revestida com uma fase estacionária que extrai os voláteis da amostra e posteriormente desorvidos no injetor do cromatógrafo (Vas et al., 2004).

### **Extracção de Gordura**

Para ser possível estudar o grau de qualidade e estabilidade oxidativa das matérias-primas e dos produtos finais, é necessário recorrer à extracção da gordura que fazem parte do produto em estudo.

Não existe um método oficial para a extracção de gordura residual de alimentos proteicos, o que leva a que vários métodos de extracção sejam utilizados (Gray, 2015). O solvente para extracção de gordura deve ser escolhido com base em vários critérios como ponto de ebulição baixo, de alta solubilidade com lípidos, capacidade de evaporar rapidamente e não deixar nenhum resíduo, baixa afinidade para a humidade, e de baixo custo (Min et al., 2010). Os solventes orgânicos que são vulgarmente utilizados para extrair os lípidos são éter etílico, éter de petróleo, pentano, hexano, e suas combinações. Os triglicerídeos são solúveis em solventes não polares, tais como hexano e éter de petróleo (Min et al., 2010).

Existem vários métodos possíveis para a obtenção de gordura a partir de subprodutos animais ou até mesmo a partir do produto final. De acordo com o âmbito do estágio que está a ser realizado, foram testados vários métodos para avaliar: a eficácia do processo de extração, ou seja, o rendimento de extração, o tempo necessário para a extração, a razão entre a quantidade de solvente necessária e a amostra. No processo de extração, levam-se em conta três etapas principais: a penetração do solvente no tecido; a formação de uma micela intracelular e a difusão do extracto na micela externa (Brum et al., 2009). O processo consiste no tratamento sucessivo e intermitente da amostra imersa num solvente puro (éter de petróleo, éter dietílico ou n-hexano são os mais utilizados), e a posterior condensação do solvente aquecido dentro do balão (Brum et al., 2009).

Um dos métodos clássicos para a extração da fracção lipídica é o método de Soxhlet, este, com refluxo de solvente por muitas horas, deve ser evitado, já que favorece as reacções de peroxidação e de hidrólise. No entanto, este apresenta diversas vantagens como o facto de a amostra estar sempre em contacto com o solvente, havendo sua constante renovação; a temperatura do sistema mantém-se relativamente alta, visto que o calor aplicado para o processo de evaporação é constante. É uma metodologia que possibilita a extração de uma quantidade maior de amostra em relação a outros métodos, sem a necessidade de filtração após o final da extração, pois a amostra está envolta no cartucho durante todo o procedimento (Brum et al., 2009).

### **Índice de Peróxidos**

O índice de peróxidos de um óleo ou gordura é um método analítico que mede a concentração de hidroperóxidos. Estes compostos são formados continuamente na fase inicial da oxidação de lípidos e, portanto, são referidos como produtos de oxidação primária (Shahidi et al., 2005). O método padrão do índice de peróxidos é o método de titulação iodométrica, que é baseado na oxidação do ião de iodeto por hidroperóxidos (Antolovich et al., 2002). Geralmente este tipo de método requer sensivelmente 5,0 g de amostra, em função do valor "esperado" de peróxidos (Gray, 2015). Nos métodos utilizados há então uma adição de uma solução saturada de iodeto de potássio à amostra para iniciar uma reacção com os hidroperóxidos (Gray, 2015). O iodo é então libertado, titulado com uma solução de tiosulfato de sódio, e o amido é adicionado como indicador (Gray, 2015).

Um valor baixo de peróxidos pode significar tanto o início ou oxidação avançada, e podem ser distinguidas através da medição de produtos secundários (Min et al., 2010). Uma gordura de alta qualidade terá um valor de peróxidos de zero, ao contrário de uma gordura com má qualidade, cujo valor de peróxidos rondará os 10 mmol / kg (Min et al., 2010).

Por isso, é importante impedir o início da formação de radicais livres, que poderá ser feito pelo manuseamento adequado de produção e armazenamento. Substâncias antioxidantes naturais (vitamina E por exemplo) e sintéticas como a etoxiquina ou BHT que podem ser incorporadas para diminuir a oxidação dos ácidos gordos dos subprodutos animais (Belitz et al., 2009; Gray, 2015).

O método de titulação iodométrica tem algumas desvantagens, como por exemplo a falta de sensibilidade, a dificuldade em determinar o ponto final da titulação (neste caso deve-se optar por se medir o valor de absorvência, a 350 ou 290 nm) intensidade em termos de trabalho, e na geração de grandes quantidades de reagente e de resíduos de solvente (Gray, 2015).

### **Índice de Acidez**

Os ácidos gordos são ácidos carboxílicos que apresentam cadeias longas e insaturadas ou saturadas na sua constituição. Por serem ácidos carboxílicos, os ácidos gordos podem ser neutralizados por acção de uma base forte, como o hidróxido de sódio (NaOH) e o hidróxido de potássio (KOH), na presença de fenolftaleína como indicador (Gray, 2015).

Se os ácidos gordos são constituintes dos óleos e gorduras na forma de mono, di e triglicerídeos, uma grande quantidade de ácidos gordos livres indica que o produto está com um acelerado grau de deterioração e como consequência, o produto torna-se mais ácido (Belitz et al.2009).

A acidez de uma gordura é frequentemente expressa em termos de ácidos gordos livres, a qual é medida como uma quantidade em mg de hidróxido de sódio necessários para neutralizar os ácidos gordos livres de 1 g de gordura. A determinação, em geral, é feita em relação ao ácido oleico como padrão.

## **2. Objetivos do trabalho**

O presente trabalho integrado no estágio curricular do Mestrado em Biotecnologia Alimentar pela Universidade de Aveiro e que decorre na empresa Ovargado S.A. teve como principal objetivo a implementação de metodologias de rotina no controlo de qualidade, nomeadamente na determinação da oxidação lipídica das matérias-primas e o estudo da oxidação lipídica de matérias-primas e de produto final em alimentos compostos para animais.

Para que seja possível uma implementação de todo este tipo de análises na empresa Ovargado, é necessário primeiramente otimizar todos os métodos: desde a extração de gordura, para que depois seja possível a avaliação do índice de peróxidos e do nível de acidez.

Estudo da oxidação lipídica nas matérias-primas e nas rações de animais de companhia (cães e gatos) ao longo do tempo de armazenamento através da análise de índice de peróxidos e acidez total de gorduras animais com e sem antioxidante e em diferentes condições de armazenamento, farinhas de carne, farinha de aves, farinha de penas, farinha de mistura de aves e farinha de peixe assim como a diferentes tipos de produto final em diferentes condições de armazenamento.

### 3. Materiais e Métodos

#### 3.1 Extração de Gordura

Uma das consequências inerente aos objetivos propostos para este estágio foi a implementação do método de extração de gordura de subprodutos de origem animal e também em alimentos compostos para animais de companhia (*pet food*). Para tal, foram testados em laboratório diferentes métodos extrativos, entre eles, o método de Soxhlet e extrações sólido-líquido através de filtração a vácuo em que se fizeram variar os parâmetros a fim de otimizar a metodologia extrativa.

Em todas as metodologias, foram utilizadas inicialmente 20 gramas de amostra de Farinha de Carne, fazendo variar o volume de solvente e também o tempo de contacto/agitação entre o solvente e a amostra, o solvente utilizado em todos os métodos foi o n-hexano. Foram também utilizadas sempre duas réplicas para cada método.

**Tabela 5** – Caracterização da amostra utilizada na otimização do processo de extração; Análise obtida por espectroscopia de infravermelho próximo (NIR) (%);

	Cinzas	Fibra	Gordura	Humidade	Proteína Bruta
Farinha de Carne	35,20	0,42	13,50	3,13	46,44

#### Método de Soxhlet:

A quantidade de solvente utilizado foi de 150 mL e o tempo de duração da extração foi de 4 horas, onde cada ciclo neste processo, depois da devida estabilização durou cerca de 4/5 minutos, gerando em média 13 a 14 ciclos por hora, perfazendo um total de cerca de 55 ciclos. Após as 4 horas, procedeu-se à evaporação do solvente no evaporador rotativo até à secura. Efetuou-se a sua quantificação por gravimetria.

#### Extração N°1:

Tendo por base o rendimento obtido pelo método de Soxhlet, foram testados métodos mais simples de implementar na empresa. Manteve-se a amostra sob agitação durante 90 minutos e posteriormente seguiu-se a filtração. A quantidade de solvente utilizado foi de 30 mL e no final, procedeu-se à evaporação do solvente e respetiva secagem e pesagem.

**Extração N°2:**

Já nesta extração, a única variável que diferenciava da Extração N°1 Método 1 foi o tempo de contacto entre o solvente e a amostra, que passou para 60 minutos, em substituição dos 90 minutos. A quantidade de solvente utilizado manteve-se constante, 30 mL.

**Extração N°3:**

Neste caso, a quantidade de solvente utilizado foi de 10 mL e 30 minutos de agitação. Realizou-se 3 extrações consecutivas, cada uma procedida de filtração e renovação do solvente, o que resultou num total de 90 minutos e 30 mL em 3 extrações.

**Extração N°4:**

Neste caso, a quantidade de solvente utilizado foi de 30 mL e 30 minutos de agitação. Realizou-se 3 extrações consecutivas, cada uma procedida de filtração e renovação do solvente. O tempo total de agitação e contacto entre solvente e amostra foi de 90 minutos e o volume total de solvente utilizado foi de 90 mL, nas 3 extrações.

**Extração N°5:**

Neste caso, a quantidade de solvente utilizado foi de 30 mL e 10 minutos de agitação. Realizou-se 4 extrações consecutivas, cada uma procedida de filtração e renovação do solvente. O tempo total de agitação e contacto entre solvente e amostra foi de 40 minutos e o volume total foi de 120 mL de solvente, nas 4 extrações 40 minutos.

Com o objetivo de aumentar a quantidade de gordura obtida no processo de extração, a quantidade de amostra a ser utilizada passou de 20 gramas para 50 gramas e a partir desse ponto, foram selecionadas três tipos de farinhas diferentes, tanto com altos teores em gordura como a farinha de aves (cerca de 22%), com baixos teores em gordura como a farinha de peixe (aproximadamente 7%) assim como também farinha de carne e osso, cujos valores de teores em gordura se situam nos 12,5 %, de forma a otimizar o método para todos os tipos de farinha utilizados na produção de *pet food*.

## **3.2 Amostragem de Matérias-Primas**

Tendo em conta o objetivo deste trabalho, foram selecionadas diversas matérias-primas cujo teor de peróxidos se reflete na qualidade do produto final e depende do estado de deterioração/conservação das matérias-primas. Entre várias matérias-primas utilizadas, podemos encontrar subprodutos de origem animal com diferentes



características, sendo a variação em teor de gordura o parâmetro mais relevante para este estudo.

Foram utilizadas seis diferentes tipos de matéria-prima como Farinha de Carne e Osso, Farinha de Aves, Farinha de Penas, Farinha de Mistura de Aves, Farinha de Peixe e Gordura de Aves.

**Tabela 6** – Caracterização química obtida por NIR das diferentes amostras de matéria-prima utilizadas (%);

	<b>Cálcio</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Fibra</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Gordura</b>	<b>Humidade</b>	<b>Proteína Bruta</b>
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo A</b>	9,7	34,39	0,99	4,9	11,2	4,4	48,8
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo B</b>	10,7	34,8	0,32	5,5	7,7	3,02	52,7
<b>Farinha de Aves</b>	7,3	19,1	0,63	3,02	21,9	7,4	49,8
<b>Farinha de Penas</b>	-	10,2	-	-	20,6	8,7	74,3
<b>Farinha Mistura de Aves</b>	3,5	13,2	0,96	1,4	26,1	6,9	53,07
<b>Farinha de Peixe</b>	-	18,6	-	-	6,9	8,9	59,4
<b>Gordura de Aves</b>	-	-	-	-	100	-	-

Foram recolhidas três amostras diferentes de gordura de aves, provenientes de três lotes diferentes, os valores de peróxidos e acidez representam a média e desvio padrão dos três valores obtidos em cada avaliação. Estas foram acondicionadas num silo exterior, cuja temperatura ronda os 45°C, este silo exterior alimenta um silo interior cuja temperatura ronda os 85°C.



**Figura 11** – Esquema representativo da passagem do silo exterior a 45°C para um silo interior a 85°C (adaptado de [www.renoger.com](http://www.renoger.com), Acesso em Dezembro de 2016)

No caso do presente estudo, o tempo de permanência no silo exterior do lote de gordura foi cerca de uma semana (o tempo de permanência depende da quantidade de gordura que chegar à empresa) enquanto que num silo interior o tempo de permanência é sempre cerca de 24 horas. Foi retirada uma amostra do silo exterior ao terceiro dia de armazenamento e analisada. Cerca de 24 horas depois, foi analisada a amostra que se encontrava no silo interior. Este tipo de procedimento foi aplicado a gordura com e sem antioxidante (etoxiquina).

Foi ainda simulada uma situação que envolvia o mesmo lote de gordura analisado à chegada, dividido em duas aliquotas, uma com e outra sem antioxidante em que foram simuladas as condições de armazenamento de um silo interior (85°C, 24 horas), de forma a perceber o desenvolvimento da deterioração de uma gordura com o mesmo ponto de partida com e sem antioxidante. Em todos os ensaios foi usada a mesma gordura de aves, o antioxidante utilizado foi a Etoxiquina, estabelecido previamente pela empresa, numa dose de 19 mg de antioxidante por kg de produto. Todos os lotes de gordura sofreram a análise de índice de peróxidos e acidez imediatamente após a receção.

Foram avaliados neste estudo dois tipos diferentes de farinha de carne e osso com diferentes teores de gordura de forma a estudar as possíveis alterações que este produto possa sofrer ao longo do tempo de armazenamento. Os dois tipos de farinha foram

armazenados nas mesmas condições: a temperatura ambiente e devidamente protegidos de qualquer tipo de luz, em embalagens de plásticos de dimensões reduzidas, devidamente acondicionados de forma a limitar o contacto com o oxigénio.

As amostras da farinha de aves, farinha de mistura de aves, farinha de penas e peixe foram armazenadas a temperatura ambiente ( $21,1 \pm 1,5$  °C) e retirada a amostra para análise no próprio dia. Todas estas amostras foram acondicionadas de forma a limitar o contacto entre o oxigénio e a amostra e protegidas diretamente da luz solar.

### 3.3 Amostragem de Produto final

Os produtos finais estudados ao longo do tempo de armazenamento foram produzidos pela Ovargado S.A. e ensacados no momento da sua produção. Cada tipo de ração foi acondicionado em dois tipos diferentes de saco: em saco de papel, impermeável à luz solar, devidamente selado mas sujeito a temperatura ambiente e em saco de rafia, este mais suscetível e permeável à luz solar ao oxigénio.

Os diferentes tipos de rações foram armazenados em locais diferentes, de maneira a simular condições tanto de armazenamento em grandes armazéns de distribuição como também simular condições ideais de acondicionamento (consumidor final cuidadoso). As amostras foram então distribuídas tanto em embalagem de papel como em rafia no armazém da empresa, com uma temperatura média de  $21,1 \pm 6,2$  °C, onde está mais sujeito a maiores variações de temperatura e no laboratório com uma temperatura média  $18,3 \pm 2,2$  °C.



**Figura 12-** Tipos de embalagem utilizadas. Esquerda: Papel. Direita: Ráfia

Foram estudados diferentes tipos de amostras de alimentos compostos para cães e gatos, cuja diferença mais significativa entre elas são os teores de gordura. Do tipo 1 ao tipo 5 o teor em gordura aumenta, a fim de avaliar/simular comportamento das rações em função do teor de gordura. Para além do teor de gordura os diferentes tipos de amostras são também diferenciados pelo teor de proteína, pelo facto de serem destinadas a diferentes faixas etárias ou animais de companhia, como por exemplo: o Tipo 1 é destinado a cães já adultos em regime de manutenção enquanto que o Tipo 2 é destinado a cães dentro de uma faixa etária jovem, com maiores necessidades a nível nutricional já que se encontram em fase de crescimento. O Tipo 3 é relativo a gatos, e em relação ao Tipo 4 e 5, são caracterizados por teores de gordura e proteína relativamente mais elevados do que em comparação com todos os outros tipos, referenciados como Alta Energia e Alta Energia Extra respetivamente como se pode observar pela Tabela 7.

A caracterização química destes produtos foi realizada por NIR e a avaliação dos valores iniciais de peróxidos e acidez foi realizada da mesma forma que nas matérias-primas.

**Tabela 7** – Caracterização das diversas amostras de produto final utilizadas ao longo do estudo (resultados obtidos por NIR);

	<b>Cálcio</b>	<b>Cinzas</b>	<b>Fibra</b>	<b>Fósforo</b>	<b>Gordura</b>	<b>Humidade</b>	<b>Proteína Bruta</b>
<b>Tipo 1 Manutenção</b>	2,81	10,5	4,46	1,44	<b>9,04</b>	8,37	24,1
<b>Tipo 2 Cachorros</b>	3,49	11,1	3,92	1,68	<b>12,5</b>	8,10	29,9
<b>Tipo 3 Gatos</b>	3,52	11,8	3,91	1,69	<b>13,05</b>	7,91	31,4
<b>Tipo 4 Alta Energia</b>	2,62	10,2	3,56	1,6	<b>14,8</b>	9,03	31,1
<b>Tipo 5 Alta Energia Extra</b>	2,90	11,1	3,86	1,73	<b>15,2</b>	9,24	31,5

Os produtos finais são naturalmente constituídos por percentagens diferentes dos diversos subprodutos de origem animal, de forma a englobar as necessidades nutricionais das diferentes faixas etárias e fases de desenvolvimento dos animais, como se pode ver pela Tabela 8. Relativamente à farinha de aves, dependendo dos objectivos nutricionais que cada empresa pretende, o teor da mesma pode ser aumentado e subprodutos como a farinha de penas, ou farinha de mistura de aves podem entrar em equação com a farinha de aves até perfazer a percentagem de proteína e gordura pretendida ou até mesmo substituir por complete a farinha de aves.

**Tabela 8** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes referências de produto final (% em relação à constituição total);

	<b>Farinha de Carne e Osso (%)</b>	<b>Farinha de Aves (%)</b>	<b>Farinha de Peixe (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>
<b>Tipo 1 Manutenção</b>	24-25	3-4	-	2
<b>Tipo 2 Cachorros</b>	24-27	15-16	1-2	2
<b>Tipo 3 Gatos</b>	24-27	15-16	1-2	1,7
<b>Tipo 4 Alta Energia</b>	25-27	13-15	-	4-5
<b>Tipo 5 Alta Energia Extra</b>	27-29	15-17	-	5

### 3.4 Avaliação do Índice de Peróxidos e Acidez

#### Avaliação do Índice de Peróxidos

Foi utilizado uma adaptação do método ISO 3960:2007 para avaliação do índice de peróxidos, ou seja, através de uma titulação iodométrica foram avaliados os graus de oxidação das diferentes matérias-primas. Para cada titulação, foram dissolvidos, numa mistura de uma proporção de 3:2 de Ácido Acético:Clorofórmio, cerca de 5,00±0,5 g de

amostra, sendo que foram adicionados cerca de 60 mL de Ácido Acético e 40 mL de Clorofórmio. Foi preparada uma solução de iodeto de potássio 10% da qual se adicionou à mistura 10 mL e deixado em repouso durante um minuto, ao abrigo da luz.

Posteriormente foram adicionados cerca de 30 mL de água destilada e a mistura foi titulada com Tiossulfato de Sódio 0,01 M sob constante agitação até a mistura apresentar uma cor amarela/laranja clara. Neste ponto, adicionou-se cerca de 1 mL de Amido como indicador a 1%, o que tornou a amostra azul escuro e procedeu-se novamente à titulação da amostra com Tiossulfato de Sódio até ao desaparecimento da cor. Foi feito também um branco, seguido o mesmo procedimento com a exceção de adição de amostra de gordura. O cálculo do valor de peróxidos é feito da seguinte forma:

$$\frac{(A-B) \times M \times 1000}{P} = mmol/kg$$

Em que:

- A- Volume em mL de Tiossulfato gasto com a amostra;
- B- Volume em mL de Tiossulfato gasto com o branco;
- M- Concentração de Tiossulfato de Sódio (mol/L)
- P- Peso da amostra (g);

O Índice de peróxidos foi expresso em milimoles de oxigénio por kilograma de amostra, no entanto na literatura a unidade ainda usada é miliequivalentes de oxigénio por kilograma.

### **Avaliação do Índice de Acidez**

A avaliação do índice de acidez realizou-se através de uma titulação. Nesta,  $2 \pm 0,1$  g de amostra são dissolvidas numa mistura de 2:1 de Éter:Álcool e de seguida cerca de 1 mL de Fenolftaleína 1% é adicionado à mistura. Posteriormente procede-se à titulação com Hidróxido de Sódio 0,01 M até ao aparecimento da cor rosa, persistindo esta durante mais de 30 segundos e anotou-se o volume total gasto na titulação, calculando-se o teor em acidez da seguinte forma:

$$\frac{V \times M \times Mr \times 100}{P} = \%$$

Onde:

*V*- Volume de Hidróxido de Sódio gasto (L);

*M*- Concentração de Hidróxido de sódio utilizado (mol/L);

*Mr*- Massa molar do Ácido Oleico (g/mol)

*P*- Peso da amostra (g);

A acidez de uma gordura é expressa em termos de ácidos gordos livres, a qual é medida como uma quantidade em mg de hidróxido de sódio necessários para neutralizar os ácidos gordos livres de 1 g de gordura e o resultado é apresentado em percentagem de ácidos gordos livres em relação a um ácido gordo específico, que neste caso é o Ácido Oleico ( $Mr=282,4614$  g/mol).

## 4. Resultados e Discussão

### 4.1 Extração de Gordura

Tendo como referência o Método de Soxhlet, no qual obtivemos um valor médio de  $0,1134 \pm 0,0021$  g de gordura por grama de amostra, o método que apresentou melhores resultados foi o método da Extração N°5. Neste caso, foram adicionados 30 mL de n-hexano às 20g de amostra de Farinha de Carne, seguidamente procedeu-se à filtração e repetido consecutivamente até perfazer um valor de 120 mL de solvente adicionado com um tempo total de agitação de 40 minutos. Com este método, o valor obtido foi de  $0,125 \pm 0,0046$  g de gordura/ g de amostra.

Como se pode ver pela Tabela 9 observa-se que ao longo do aumento do número de renovações de solvente e consequente aumento de quantidade de solvente e tempo total de agitação a quantidade de amostra extraída aumentou. Tendo em conta que a amostra de Farinha de Carne utilizada foi caracterizada por NIR contendo 13,5% de gordura, a Extração N°5 permitiu que se obtivessem valores de rendimento de 12,5%, ainda inferiores aos obtidos por NIR mas superior ao obtido por Soxhlet, onde o rendimento foi cerca de 11,3%.

**Tabela 9** – Volume de solvente, tempo de extração e número de extrações relativos aos diferentes métodos de extração de gordura e resultados obtidos em 20 gramas de amostra;

	Volume de solvente utilizado (mL)	Tempo total de agitação/contacto solvente-amostra (minutos)	Número de Ciclos	Número de renovações de solvente	Quantidade de gordura extraída (g/g de amostra)
<b>Soxhlet</b>	150	240	55	-	<b><math>0,1134 \pm 0,0021</math></b>
<b>Extração N°1</b>	30	90	-	1	<b><math>0,1019 \pm 0,0039</math></b>
<b>Extração N°2</b>	30	60	-	1	<b><math>0,0857 \pm 0,0077</math></b>
<b>Extração N° 3</b>	30	90	-	3	<b><math>0,0507 \pm 0,0089</math></b>
<b>Extração N° 4</b>	90	90	-	3	<b><math>0,109 \pm 0,0038</math></b>
<b>Extração N° 5</b>	120	40	-	4	<b><math>0,125 \pm 0,0046</math></b>



Sendo o valor de gordura obtido pelo método da Extração N°5 o mais próximo mas ainda inferior ao determinado por NIR (13,5%). Como o objetivo não é a quantificação de gordura, parte-se do princípio que a gordura extraída é representativa do todo. No entanto foi necessário otimizar o processo de extração de gordura pela necessidade de obter maior massa de gordura para as análises de peróxidos e acidez. O processo de extração de gordura envolveu o aumento do rácio amostra/solvente para 50 g/120 mL em 4 renovações de solvente, obtendo-se naturalmente quantidades de gordura superior mas no entanto rendimentos inferiores.

No caso das farinhas de carne e osso, os rendimentos de extração obtidos foram de **10,4%** e **9,8%**, para 4 e 3 extrações, respectivamente (inferiores aos 12,5% obtidos pelo NIR). A farinha de peixe apresentou o rendimento mais próximo do determinado pelo NIR (7%), **6,25%** e **6,02%**, para 4 e 3 extrações, respectivamente, sendo estas as farinhas que apresentam menor teor em gordura. A farinha de aves, é a que apresenta um maior teor em gordura determinado pelo NIR (22%), o rendimento da extração foi de **13,93%** e **12,91%**, para 4 e 3 extrações, respectivamente.

**Tabela 10**– Volume de solvente, tempo de agitação/contacto e número de renovações de solvente relativos às diferentes matérias-primas e resultados obtidos;

	Volume de solvente utilizado (mL)	Tempo total de agitação/contacto solvente-amostra (minutos)	Número de renovações de solvente	Teor em gordura - NIR (%)	Quantidade de gordura extraída (g/g de amostra)
<b>Farinha de Carne e Osso</b>	120	40	4	<b>12,5</b>	<b>0,104± 0,0011</b>
<b>Farinha de Carne e Osso</b>	90	30	3	<b>12,5</b>	<b>0,098±0,0018</b>
<b>Farinha de Peixe</b>	120	40	4	<b>7</b>	<b>0,0625±0,0018</b>
<b>Farinha de Peixe</b>	90	30	3	<b>7</b>	<b>0,0602±0,0021</b>
<b>Farinha de Aves</b>	120	40	4	<b>22</b>	<b>0,1385±0,0020</b>
<b>Farinha de Aves</b>	90	30	3	<b>22</b>	<b>0,1291±0,0037</b>

Com o objetivo de minimizar tempo de operação e também quantidade de solvente utilizado foi ainda testada nos diferentes tipos de farinha, uma redução a nível de quantidade de solvente e tempo de contacto entre solvente e amostra, de 40 para 30 minutos e 120 para 90 mL, no entanto, observou-se que estas diminuições provocam um ligeiro mas não significativo decréscimo no rendimento obtido, sendo que no caso da farinha de aves, a qual é caracterizada pelo teor mais elevado de gordura, o decréscimo foi cerca de **1,02%**. No caso da farinha de carne a diminuição foi de **0,55%** e no caso da farinha de peixe foi de **0,23%**.

A extração utilizando 120 mL de solvente, realizando 4 renovações de solvente com um tempo total de contacto entre amostra e solvente de 40 minutos mostrou ser o processo mais eficaz correlacionando a quantidade de gordura extraída, necessária à análise de peróxidos, e o tempo total de extração assim como os gastos de solvente.

## **4.2 Avaliação de Peróxidos e Acidez em Matérias-Primas**

### **4.2.1 Gordura de Aves**

Como já referido, foram estudadas diversas situações relativamente a diferentes lotes de gordura: um dos lotes com adição de antioxidante à chegada na empresa e um lote diferente sem adição de antioxidante. Ambos foram analisados no momento da chegada e seguiram para o silo exterior, que permanece a 45°C. Silo este que alimenta o um silo interior que permanece a 85 °C.

A Tabela 11 mostra a diferença de valores de peróxido da gordura sem adição de antioxidante, do ponto inicial até ao final dos seis dias de armazenamento, com as devidas avaliações nos diferentes dias de recolhas. No primeiro ponto de recolha (ao fim de 3 dias), vê-se que existe um aumento de **18,5%** de peroxidação, atingindo um valor de índice de peróxidos de **9,35±0,15 mmol/kg** e quando a mesma amostra permanece 24 horas sob 85°C o aumento é de **34,47%** desde o valor no dia da receção da matéria-prima. O limite máximo de peróxidos e de acidez não está regulamentado, no entanto assume-se o valor recomendado na literatura, sendo 10 mmol/kg o limite aconselhável para o teor máximo em peróxidos e de 6% para o índice de acidez (Butolo, 2002).

**Tabela 11** – Acompanhamento do Índice de Peróxidos de Gordura de Aves sem adição de antioxidante (mmol/kg);

<b>Dia 0</b> <b>7,89±0,03</b>	<b>Silo Exterior</b> <b>45°C</b>		<b>Silo Interior</b> <b>85°C</b>
<b>Dia 3</b>	9,35±0,15	<b>24 horas</b> →	10,61±0,12
<b>Dia 6</b>	10,9±0,07		12,6±0,18

No último dia de recolha de amostra já o valor de peróxidos ultrapassa os 10 mmol/kg sendo que após as 24 horas sob 85 °C a variação atinge um aumento de **59,57%** desde o ponto inicial, atingindo um valor final de **12,6 ±0,18 mmol/kg**, sendo assim, para um valor inicial de 7,89 mmol/kg, as condições de armazenamento descritas promovem oxidação para valores superiores ao recomendado.

**Tabela 12** – Acompanhamento do Índice de Peróxidos de Gordura de Aves com adição de antioxidante (mmol/kg);

<b>Dia 0</b> <b>5,53±0,2</b>	<b>Silo Exterior</b> <b>45°C</b>		<b>Silo Interior</b> <b>85°C</b>
<b>Dia 3</b>	6,51±0,1	<b>24 horas</b> →	6,62±0,24
<b>Dia 6</b>	8,11±0,22		8,4±0,08

Notou-se que no caso da gordura de aves a taxa de oxidação é relativamente influenciada pelo aumento de temperatura, principalmente se esta não tiver sido previamente protegida com antioxidante, como seria de certa forma expectável (Butolo, 2002). Quando existe adição de antioxidante o valor máximo atingido de variação de peróxidos atinge os **2,87 mmol/kg**, significando um aumento de **51,9%** ao fim de 6 dias de armazenamento e já depois de 24 horas sob 85 °C, atingindo um valor de 8,4 mmol/kg como se pode ver pela Tabela 12. Estes valores vêm também de certa forma corroborar com Talbot (2016), mostrando que de facto a utilização de temperaturas superiores a 45-50 °C prejudicam a nível da oxidação dos produtos armazenados como gordura, provocando aumentos que possam ultrapassar os limites máximos aconselháveis como se pode ver na Tabela 11.

Relativamente ao índice de acidez a variação máxima em ambos os casos foi próxima: 1,4% sem adição de antioxidante (Tabela 13) e **1,1%** na presença de antioxidante (Tabela 14), demonstrando que em ambos os casos o aumento do índice de acidez não atinge valores de variação elevados, no entanto, a permanência sob 85 °C durante 24 horas permitiu o maior intervalo de variação máxima entre eles: **0,85%** sem antioxidante e no caso da adição de antioxidante **0,37%** após o 3º dia e **0,31%** no dia 6, demonstrando que o aumento de temperatura de 45 para 85 °C é um fator que proporciona, num menor tempo de armazenamento, uma considerável alteração a nível de valores do índice de acidez na gordura de aves. A energia de ativação da reação de formação de hidroperóxidos é relativamente alta (146–273 kJ/mole) (Belitz et al.; 2009), tanto que não ocorre sem algum auxílio, ou seja, não é espontânea e vai ocorrer lentamente, neste caso, o fator determinante para o despoletar da formação de hidroperóxidos é a temperatura, o que vem corroborar com o aumento de valores de peroxidação e acidez registados nos diferentes lotes de gordura principalmente quando armazenados a 85°C.

**Tabela 13** – Avaliação do Índice de Acidez de gordura de Aves sem adição de antioxidante (%);

<b>Dia 0</b> <b>4,8±0,04</b>	<b>Silo Exterior</b> <b>45° C</b>		<b>Silo Interior</b> <b>85° C</b>
<b>Dia 3</b>	5,01±0,12	<b>24 horas</b> →	5,3±0,03
<b>Dia 6</b>	5,35±0,04		6,2±0,1

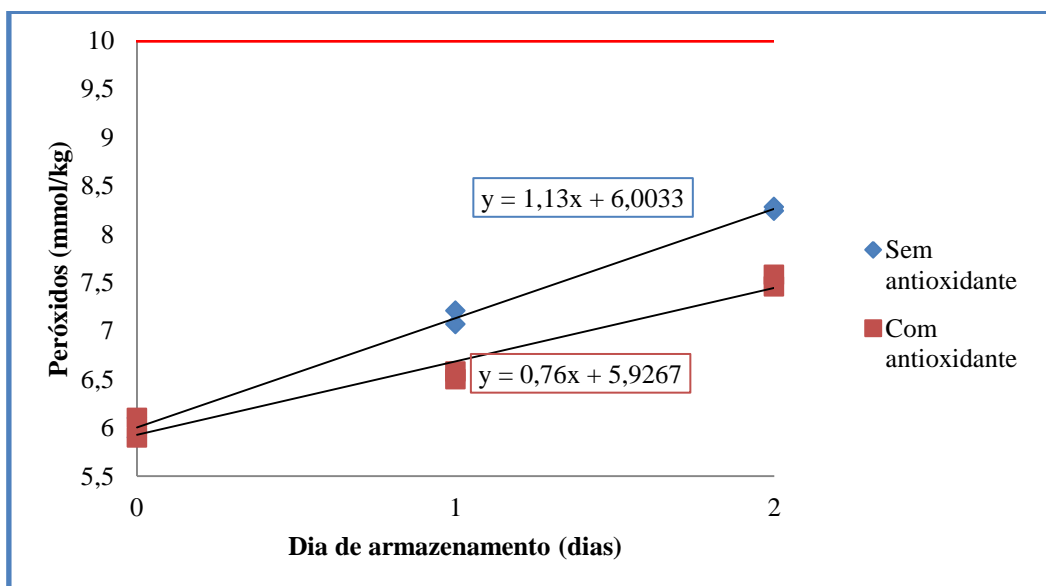
**Tabela 14** – Avaliação do Índice de Acidez de gordura de Aves com adição de antioxidante (%);

<b>Dia 0</b> <b>4,0±0,64</b>	<b>Silo Exterior</b> <b>45° C</b>		<b>Silo Interior</b> <b>85° C</b>
<b>Dia 3</b>	4,25±0,8	<b>24 horas</b> →	4,62±0,03
<b>Dia 6</b>	4,8±0,9		5,11±0,02

Foi ainda testado um lote de gordura partindo do mesmo ponto inicial de oxidação (**6,0±0,1 mmol/kg**) separado em duas amostras diferentes, uma com adição de

antioxidante e outra sem adição. Ambas as amostras foram sujeitas às mesmas condições de armazenamento, simulando as condições do silo interior (85°C e 48 horas de armazenamento), o que apresentou o valor máximo de peróxidos de **8,28 mmol/kg**, sem adição de antioxidante, enquanto na amostra com adição de antioxidante apresentou o valor máximo foi de **7,58 mmol/kg**.

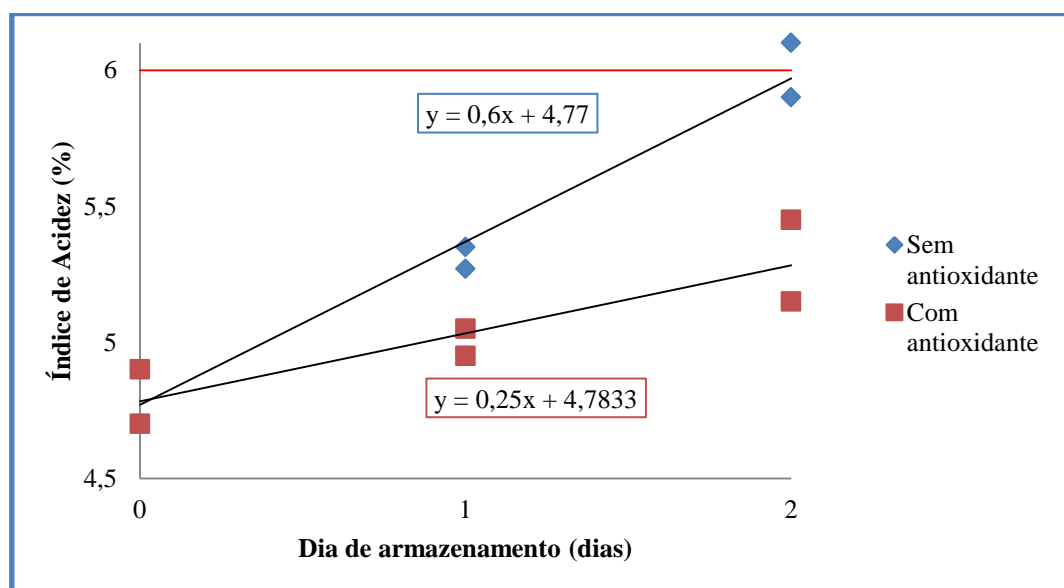
No caso da amostra sem adição de antioxidante (Figura 13) a variação média do valor de peroxidação da amostra recolhida na recepção das matérias-primas após 24 horas de armazenamento foi mais acentuada (cerca de **1,14 mmol/kg**) do que do dia 1 para o dia 2 (diferença de **1,12 mmol/kg**) enquanto que na amostra com adição de antioxidante a diferença ao fim de um dia após a recepção da matéria-prima é muito menor (**0,52 mmol/kg**) do que a diferença do primeiro para o segundo (**0,98 mmol/kg**), mostrando que é num ponto inicial que o antioxidante vai prevenir um maior aumento do valor de peroxidação, pois como se sabe, os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de retardar ou prevenir o desenvolvimento de ranço ou outro tipo de deterioração consequente do processo de oxidação lipídica, extendendo o período de indução na deterioração da gordura (Belitz et al; 2009). Uma das alternativas de forma a não promover o aumento da oxidação reflectido na Figura 13 seria a utilização de uma temperatura mais baixa a nível de armazenamento, mas que por outro lado permitisse que o nível de viscosidade da gordura não prejudicasse o processo em si, ou até mesmo a cristalização dos ácidos gordos por temperaturas inferiores (Talbot, 2016).



**Figura 13** – Evolução do Índice de Peróxidos em Gordura de Aves sem e com adição de antioxidante a 85 °C (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

Como se pode ver pela Figura 13, o declive da recta relativo à amostra sem antioxidante é superior ao da amostra com antioxidante, comprovando que a velocidade da reação de é superior na amostra desprotegida. Os antioxidantes têm esta capacidade de inibição/retardamento da oxidação por estenderem o período de indução, período no qual ocorrem poucas mudanças nos lípidos, é após este período que a deterioração lipídica ocorre mais rapidamente e a adição de antioxidantes após o final do período de indução tende a ser ineficaz no processo de retardamento da oxidação (Gordon, 2001), o que poderá justificar alguns valores mais elevados de peroxidação mesmo com adição de antioxidante na gordura de aves. Segundo Gordon (2001), os antioxidantes podem inibir ou retardar o processo de oxidação por duas vias: sequestro dos radicais livres (considerados antioxidantes primários) ou por mecanismos que não envolvam diretamente o sequestro dos radicais livres como por exemplo a ligação a iões metálicos (antioxidantes secundários). Nos últimos anos, o uso de antioxidantes sintéticos como o BHT ou BHA é limitado pelo aumento da preocupação de que estes pela possibilidade de estes terem efeitos cancerígenos (Shahidi e Zhong, 2005).

A variação média máxima da percentagem de acidez nestas amostras deu-se como de esperado na amostra sem adição de antioxidante (**1,4%**), chegando mesmo a ultrapassar os valores considerados aconselháveis para este tipo de produtos (**6%**) num dos duplicados. O aumento do índice de acidez em ambos os casos teve um comportamento linear, com uma diferença média de valores de índice de acidez de 0,7% ao final dos dois dias de armazenamento entre as duas amostras de gordura.



**Figura 14** – Acompanhamento do Índice de Acidez em Gordura de Aves com e sem adição de antioxidante 85 °C (%); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

A Tabela 15 dá-nos os valores iniciais do teor de peróxidos e acidez dos subprodutos analisados ao longo do respectivo tempo de armazenamento. Estas avaliações foram efectuadas no momento da recepção das mesmas à empresa.

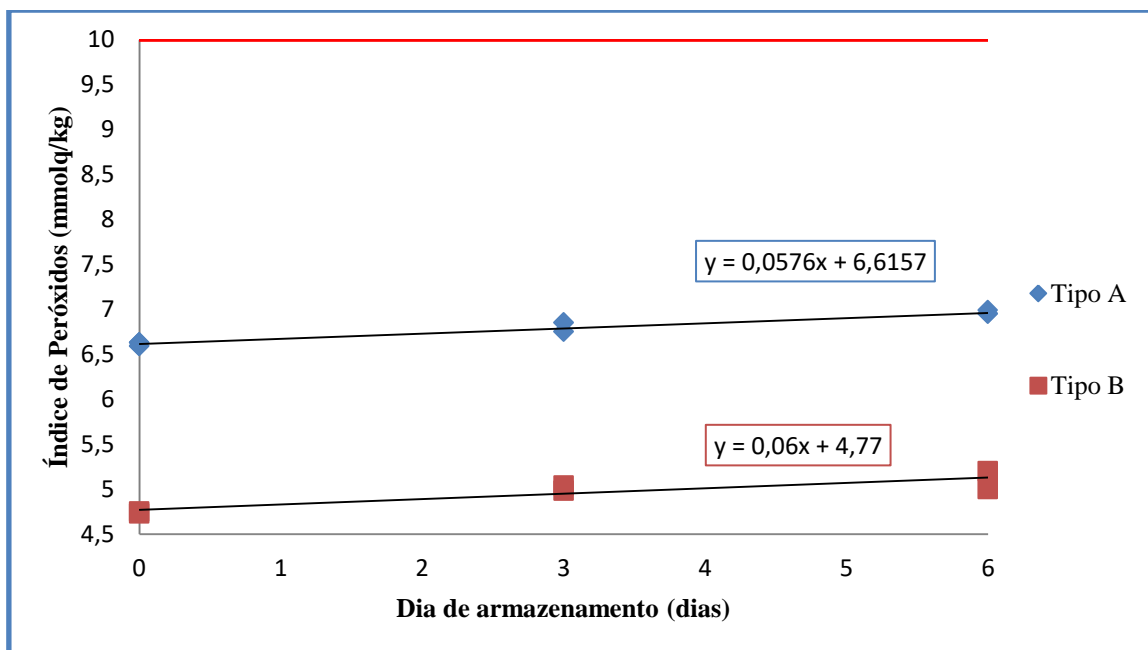
**Tabela 15-** Teor de gordura (NIR), índice de peróxidos e acidez inicial nas diversas matérias-primas no momento da recepção da matéria-prima;

	<b>Gordura (%)</b>	<b>Peróxidos (mmol/kg)</b>	<b>Índice de Acidez (%)</b>
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo A</b>	11,2	6,61±0,02	3,35±0,005
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo B</b>	7,7	4,74±0,01	3,80±0,02
<b>Farinha de Aves</b>	21,9	3,7±0,02	4,06±0,01
<b>Farinha de Penas</b>	20,6	5,20±0,15	3,80±0,06
<b>Farinha Mistura de Aves</b>	26,1	4,10±0,1	4,12±0,03
<b>Farinha de Peixe</b>	6,9	2,22±0,06	3,04±0,04
<b>Gordura de Aves</b>	100	6,47±0,94	4,86±0,86

#### 4.2.2 Farinha de Carne e Osso

Os diferentes tipos de farinha de carne testados apresentaram a mesma variação média a nível de teor de peróxidos (**0,36 mmol/kg**) apesar de diferentes teores de gordura e das diferentes condições iniciais, o que de certa forma vem mostrar que não

existe uma relação direta entre um maior teor de gordura com uma maior variação do índice de peróxidos. Uma das justificações possíveis para um valor de peróxidos baixo poderá ser a temperatura de armazenamento (temperatura ambiente), não sofrendo aumentos de temperatura e preservando dessa forma este tipo de subproduto.

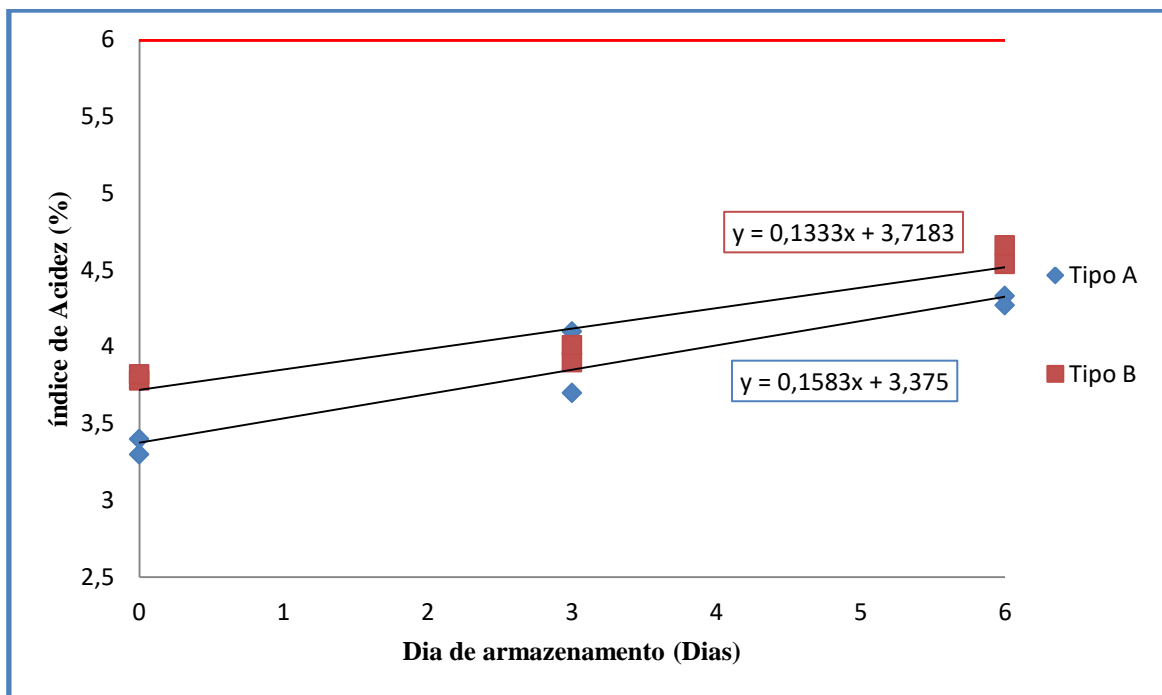


**Figura 15** – Acompanhamento do Índice de Peróxidos de diferentes fornecedores de farinha de carne, armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

Outro dos aspetos a retirar das análises aos diferentes tipos de farinha de carne é que o índice de acidez não acompanha um maior teor de peróxidos ou gordura, visto que na análise efetuada, a farinha de carne Tipo B, com menor teor de gordura e peróxido (Figura 15) apresenta no ponto inicial e final um maior índice de acidez quando comparado com a farinha do Tipo A (Figura 16).

Pela análise dos declives das retas tanto de oxidação como de acidez vê-se que a velocidade da reação de hidrólise de ácidos gordos é superior à velocidade da reação oxidativa. Isto leva a um aumento do valor de variação de acidez no final dos 6 dias de armazenamento, que é relativamente maior que o valor de variação da velocidade da reação de oxidação (ver Tabela 16). Ao longo do tempo de armazenamento a variação do dia da receção para o último dia de armazenamento foi de **0,95%** para o Tipo A e de **0,8%** para o Tipo B.



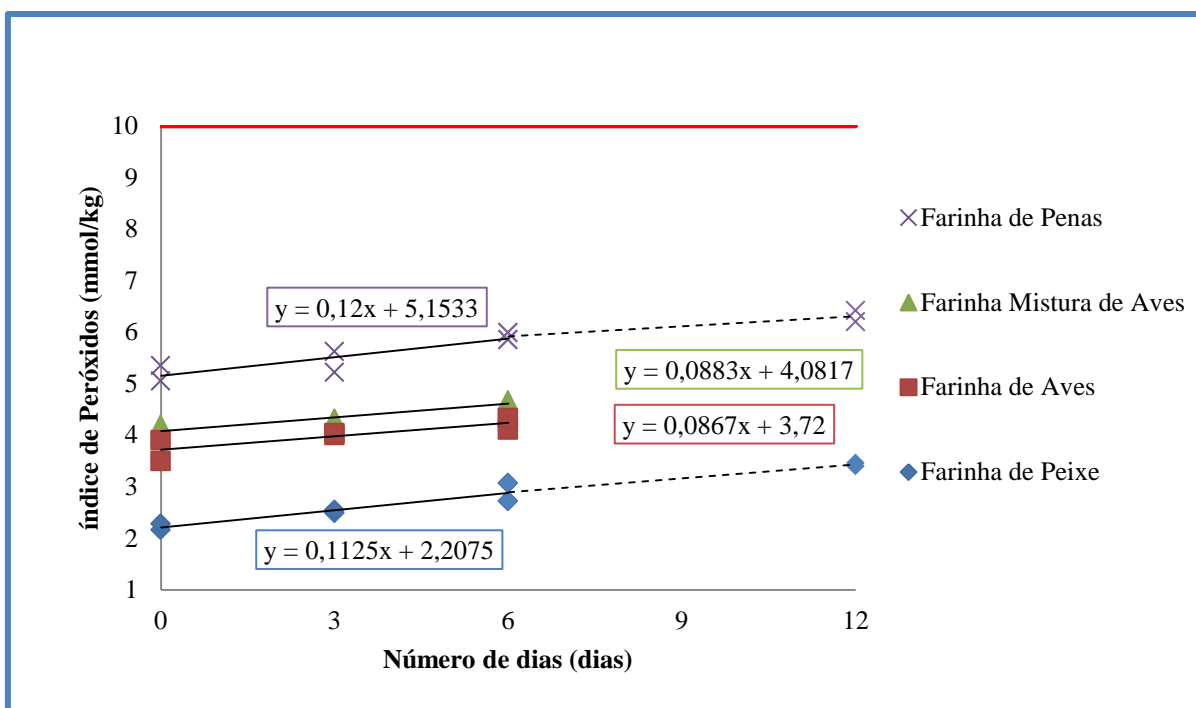


**Figura 16** – Acompanhamento do Índice de Acidez em diferentes tipos de farinha de carne, armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (%) Linha vermelha: Limite máximo aconselhável.

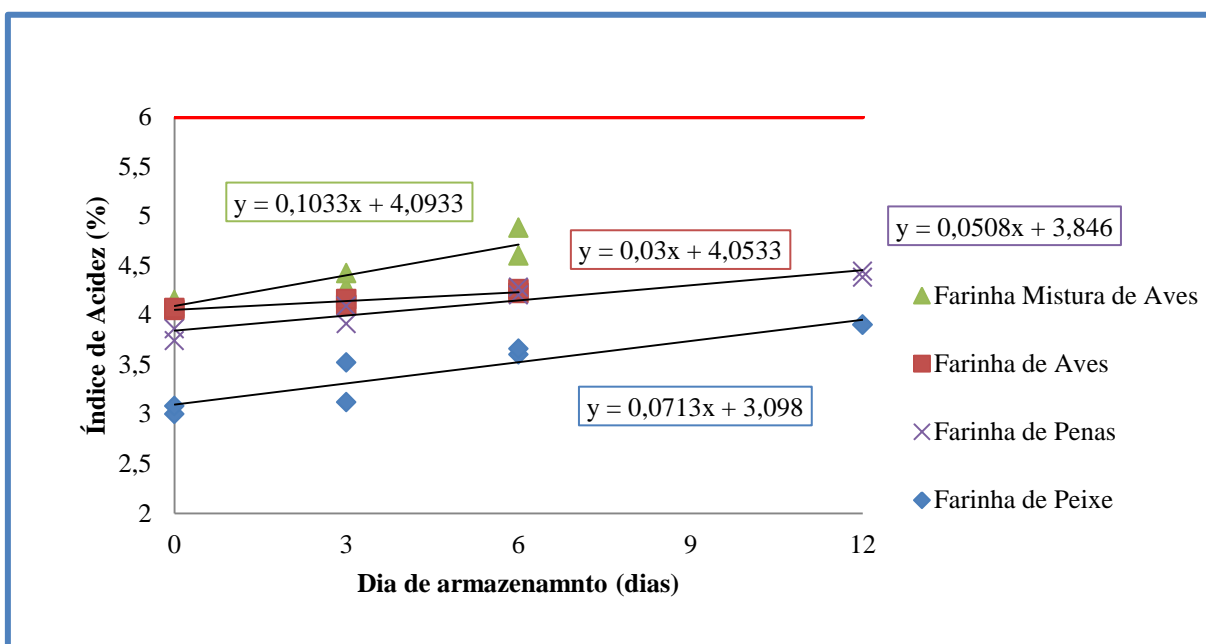
### 4.2.3 Farinha de Peixe, Aves, Mistura de Aves e Penas

Foram analisados diversos subprodutos de origem animal a nível do seu teor de peróxidos e acidez ao longo do seu tempo de armazenamento na empresa. Estes resultados estão divididos em duas figuras: a Figura 17 que reflete a evolução do teor de peróxidos e a Figura 18, relativa à evolução do índice de acidez.

A farinha de peixe mostrou também ser um produto que ao longo do tempo de armazenamento, partindo de um ponto inicial com um índice de peróxidos baixo ( $2,22 \pm 0,06$  mmol/kg) sofre uma maior variação (explicado no final do capítulo dos subprodutos de origem animal), registando-se no aumento de **54,5%**, apresentando mesmo assim, ao fim de 12 dias de armazenamento um valor relativamente baixo de peroxidação de  $3,43 \pm 0,03$  mmol/kg. O índice de acidez neste tipo de farinha também demonstrou ter um comportamento linear, com uma variação de **28,3%** ao fim do tempo de armazenamento, fixando em **3,9%** o valor final do índice de acidez.



**Figura 17** – Evolução do Índice de Peróxidos em diferentes subprodutos de origem animal armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (mmol/kg); Linha vermelha: Limite máximo aconselhável.



**Figura 18** – Evolução do índice de acidez em diferentes subprodutos de origem animal armazenadas a uma temperatura média  $21,1 \pm 1,5$  °C (%) Linha vermelha: Limite máximo aconselhável.

Pelas figuras 17 e 18 vê-se também que a farinha de aves, tanto a nível do índice de peróxidos como de acidez não mostrou grande variação tendo como comparação o ponto de receção da matéria-prima e o último dia de armazenamento, sendo que a nível

de peróxidos, sofreu um aumento de **12,7%** ao final do tempo de armazenamento e o índice de acidez revelou um aumento total de **4,4%**, registando um aumento do valor percentagem de acidez de **0,18%**.

A farinha de mistura de aves apresenta um comportamento similar à farinha de aves: valores de peróxido e acidez relativamente baixos e com uma variação de valor final em relação à inicial reduzida. Os índices testados neste tipo de farinha obtiveram uma variação de sensivelmente **0,64 mmol/kg**, correspondente a **15,61%** de aumento a nível de peróxidos e **0,53%** a nível percentual no caso da acidez.

A farinha de penas não apresenta também grande diferença entre os valores iniciais e finais. Este produto, que apresenta por determinação por NIR um menor teor em gordura, tende a estabilizar a partir do sexto dia de armazenamento mostrando de certa forma que não é tão linear a evolução do teor de peróxidos como nos primeiros 6 dias, tendo registado uma diferença média de **1,1 mmol/kg** resultando num aumento de **21,4%** a nível de peróxidos desde o primeiro ponto de avaliação e um valor médio de **0,18%** a nível de diferença percentual de acidez.

Relativamente aos subprodutos apresentados de farinha de penas e farinha de peixe, a linha de tendência não apresenta um comportamento linear a nível de formação de peróxidos após o 6º dia de armazenamento, existindo uma certa estabilização, registando-se uma variação de **7,42%** nos últimos 6 dias de armazenamento e de **0,16%** a nível de acidez no caso da farinha de penas. Esta estabilização a nível de peróxidos está relacionada com o facto de após os seis dias de armazenamento o estado da oxidação se encontrar numa fase final do estado de propagação e se encontrar já numa fase de estabilização. Esta estabilização dos radicais peróxido ( $\text{ROO}\bullet$ ) faz com que todo o processo seja limitado pela conversão destes radicais livres em moléculas de hidroperóxidos ( $\text{ROOH}$ ), desta forma, a quebra das cadeias de hidroperóxidos ficam diretamente influenciadas pela maior ou menor taxa de formação dos mesmos (Belitz et al., 2009).

**Tabela 16** – Relacionamento dos diferentes subprodutos de origem animal e respectivos teores em gordura e proteína (Determinados por NIR) com a variação de peróxidos e acidez ao fim de 6 e 12 dias e correspondente valor absoluto final;

	<b>Gordura (%)</b>	<b>Proteína (%)</b>	<b>Variação de Peroxidação - 6 dias (%)</b>	<b>Valor de Peróxidos final (mmol/kg)</b>	<b>Variação de Acidez- 6 dias (%)</b>	<b>Valor de acidez final (%)</b>
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo A</b>	11,27	48,84	+5,4%	6,97	+28,35%	4,3
<b>Farinha Carne e Osso – Tipo B</b>	7,72	52,70	+7,6%	5,1	+21,05%	4,6
<b>Farinha de Aves</b>	21,98	49,82	+14,1%	4,22	+4,4%	4,24
<b>Farinha de Penas</b>	20,65	74,32	+13,8% +21,4% *	6,31	+11,6% +16,1% *	4,41
<b>Farinha de Mistura de Aves</b>	26,19	53,07	+12,9%	4,63	+15,04%	4,74
<b>Farinha de Peixe</b>	6,95	59,46	+30,4% +54,5% *	3,43	+19,7% +28,3% *	3,9

\* Variação de Peroxidação no final de 12 dias (%).

É possível concluir que alguns subprodutos poderão ser mais suscetíveis que outros, como por exemplo a farinha de peixe que apresenta variações relativamente elevadas a nível de peróxidos, na ordem dos **54,5%** que poderá ser justificado pela sua composição em ácidos gordos, que comparado com outros subprodutos de origem animal apresenta um maior número de grupos insaturados que são mais susceptíveis à oxidação (Leeson et al., 2005). Para além deste aspeto, este tipo de matéria-prima caracteriza-se por ter elevados teores em proteína, sendo que a peroxidação é acelerada pela presença da hemoglobina, mioglobina e Citocromo C nos tecidos animais (Belitz et

al., 2009). É também importante realçar que todos os subprodutos contêm altos teores em proteína, sendo o valor mínimo de **48,64%** na Farinha de Carne e Osso, logo, este processo poderá ter influência na maioria dos subprodutos. A evolução ao longo do tempo de armazenamento a nível da libertação de ácidos gordos vem também comprovar os trabalhos de Kim et al. (2014) e Mujahid et al. (2005), que afirmam que apesar dos processos térmicos aplicados aos subprodutos, a atividade de enzimas hidrolíticas não é totalmente cessada, mostrando ao longo do tempo de armazenamento ligeiros aumentos a nível do índice de acidez apesar dos diferentes estados iniciais de cada subproduto.

### 4.3 Índice de Peróxidos e Acidez em produto final

A Tabela 17 apresenta o teor de gordura analisado pelo NIR com os índices de peróxidos e acidez iniciais de cada tipo diferente de produto final. Como se pode observar, a denominação dos diferentes tipos está relacionada com os diferentes teores de gordura, do menor (Tipo 1) até a produtos finais com teores mais elevados (Tipo 5).

**Tabela 17-** Relação entre o teor de Gordura (analisado por NIR) e os valores de Peróxidos e Acidez iniciais dos diferentes tipos de produto final;

	<b>Gordura (%)</b>	<b>Peróxidos (mmol/kg)</b>	<b>Índice de Acidez (%)</b>
<b>Tipo 1 Manutenção</b>	9,04	2,90±0,11	4,10±0,02
<b>Tipo 2 Cachorros</b>	12,50	1,30±0,03	3,20±0,01
<b>Tipo 3 Gatos</b>	13,05	1,9	3,65±0,15
<b>Tipo 4 Alta Energia</b>	14,80	2,30±0,02	3,90±0,02
<b>Tipo 5 Alta Energia Extra</b>	15,21	3,20±0,02	4,50±0,01

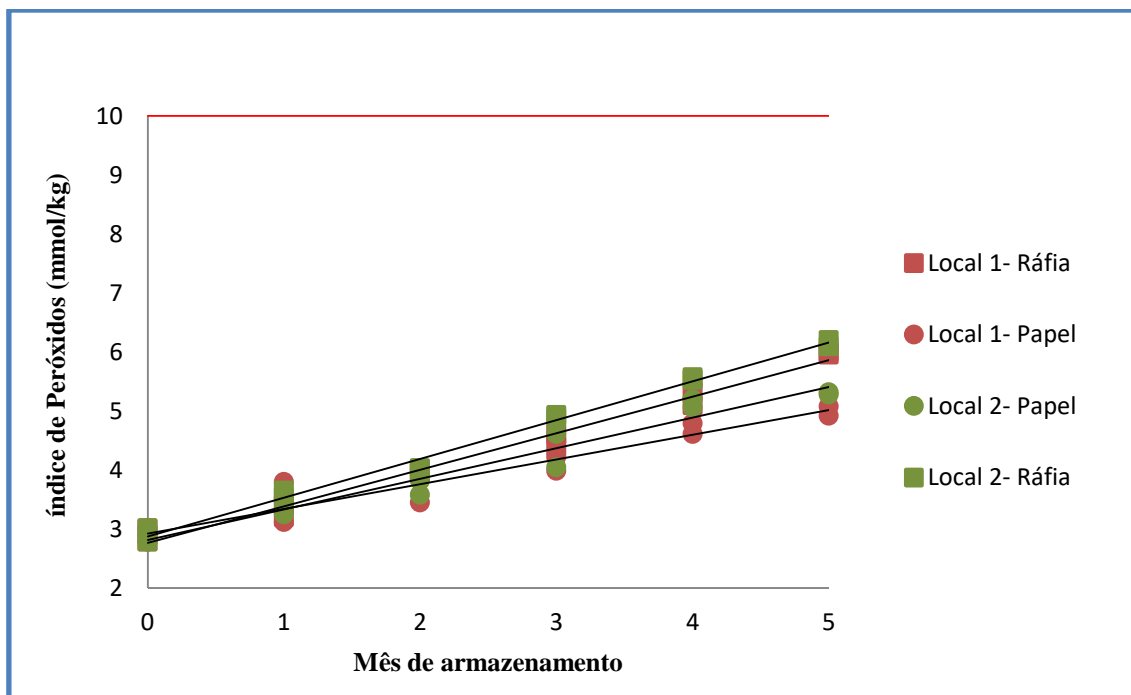
## Tipo 1- Manutenção

O produto final tipo 1 apresenta na sua constituição, como já demonstrado previamente, diferentes proporções de diferentes subprodutos de origem animal.

**Tabela 18** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção de produto final Tipo 1-  
Manutenção (% em relação à constituição total);

	<b>Farinha de Carne e Osso (%)</b>	<b>Farinha de Aves (%)</b>	<b>Farinha de Peixe (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>
<b>Tipo 1 Manutenção</b>	24-25	3-4	-	2

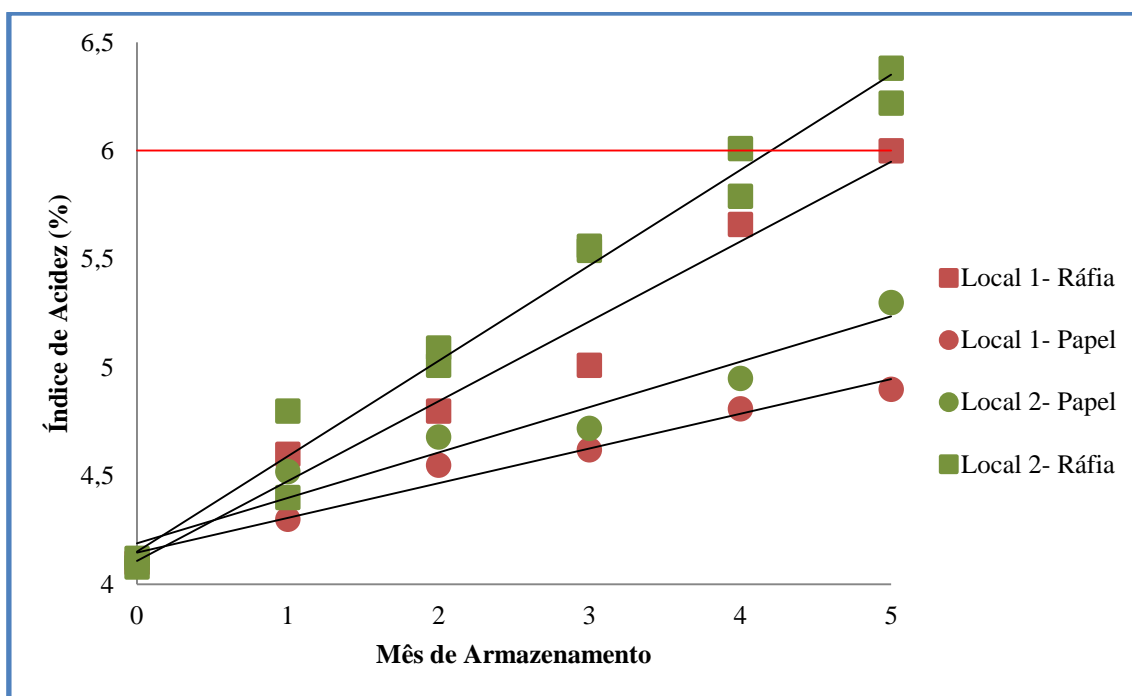
Como se pode observar através da Figura 19, o desenvolvimento a nível de peróxidos em produto final do tipo 1 ao longo dos 5 meses de armazenamento foi maior no Local 2-Ráfia (local referente ao armazém da empresa que ao longo dos meses de armazenamento registou uma temperatura média de  $21,1 \pm 6,2$  °C). Esta referência para este tipo de produto final apresentou um aumento de cerca de  **$3,25 \pm 0,02$  mmol/kg**, seguido do Local 1-Ráfia (laboratório da empresa, temperatura média de  $18,3 \pm 2,2$  °C), que registou um aumento de  **$3,08 \pm 0,02$  mmol/kg**. Estes resultados permitem identificar que o tipo de saco com maior permeabilidade à ação do oxigénio e luz solar regista maior aumento a nível de oxidação. Para cada tipo de saco, o Local 2 é o que promove a oxidação, quando comparado com o Local 1, confirmando os resultados de Tsutzuki et al (2014) que referiam o mesmo contacto com o oxigénio e aumento de temperatura como fatores que exponenciavam a oxidação lipídica.



**Figura 19** – Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 1-Manutenção ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

A nível de acidez, uma variação na ordem dos  $2,2 \pm 0,08$  % ao fim dos 5 meses de armazenamento veio corroborar a ideia de que o Local 2 juntamente com o ensaque de ráfia são as condições menos desejadas para a preservação do produto, chegando mesmo a ultrapassar os limites aconselháveis nesta referência a partir do mês 4, assim como o tipo de ensaque Ráfia mesmo no Local 1, ao fim dos 5 meses, atinge já os 6%, máximo aconselhável.

Como já referido em capítulos anteriores, o processo de oxidação é induzido pelo contacto entre o radical livre com o oxigénio molecular, em reação com outra molécula oxidável, induzindo a formação de um hidroperóxido e outro radical livre. Uma vez que existe uma maior permeabilidade nos produtos em embalagens de ráfia são desencadeados processos de oxidação, fazendo aumentar o valor de peróxidos e acidez (Chow e Tatum, 2008; Belitz et al., 2009).



**Figura 20** – Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 1-Manutenção ao longo do tempo de armazenamento (%); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

## Tipo 2 - Cachorros

O produto final de Tipo 2, caracterizado por um teor de gordura mais elevado quando comparado com o Tipo 1 (Tabela 17) apresenta um comportamento menos desejável ao final dos 5 meses de armazenamento, tendo mesmo ultrapassado os valores aconselhados de peróxidos na ração armazenada no Local 2, em embalagem de ráfia, registando um aumento de cerca de **356%** até aos cinco meses de armazenamento.

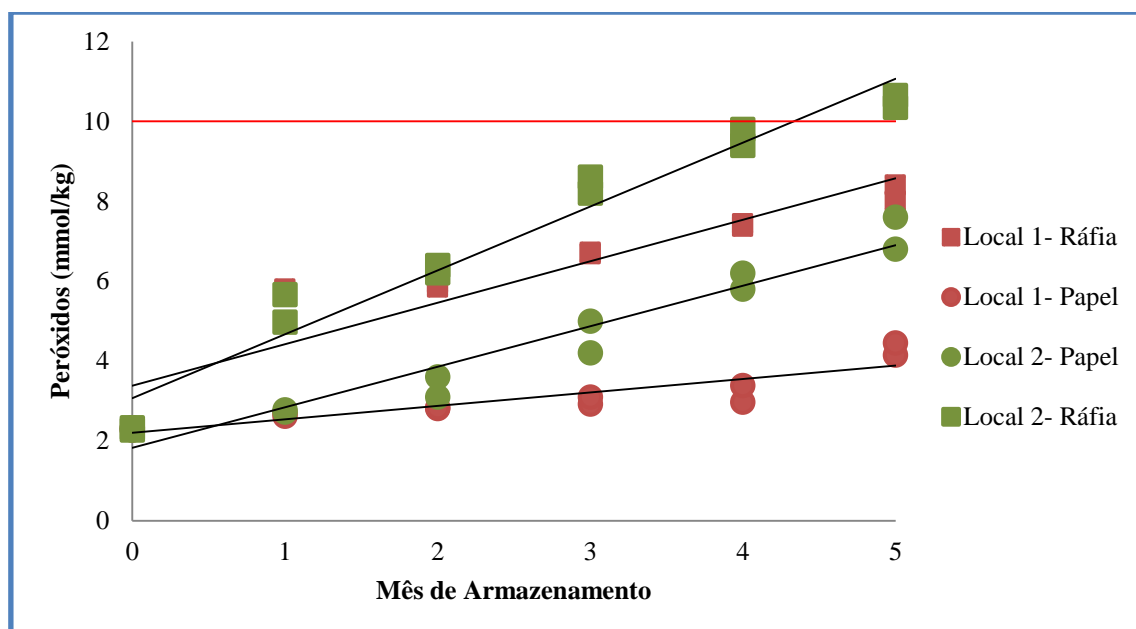
**Tabela 19** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção de produto final Tipo 2- Cachorros (% em relação à constituição total);

	Farinha Carne e Osso (%)	Farinha de Aves (%)	Farinha de Peixe (%)	Gordura (%)
<b>Tipo 2 Cachorros</b>	24-27	15-16	1-2	2

Todas as outras referências tiveram um comportamento linear e similar ao Tipo 1, sendo novamente a referência Local 1- Ráfia a que mais se aproxima dos valores da

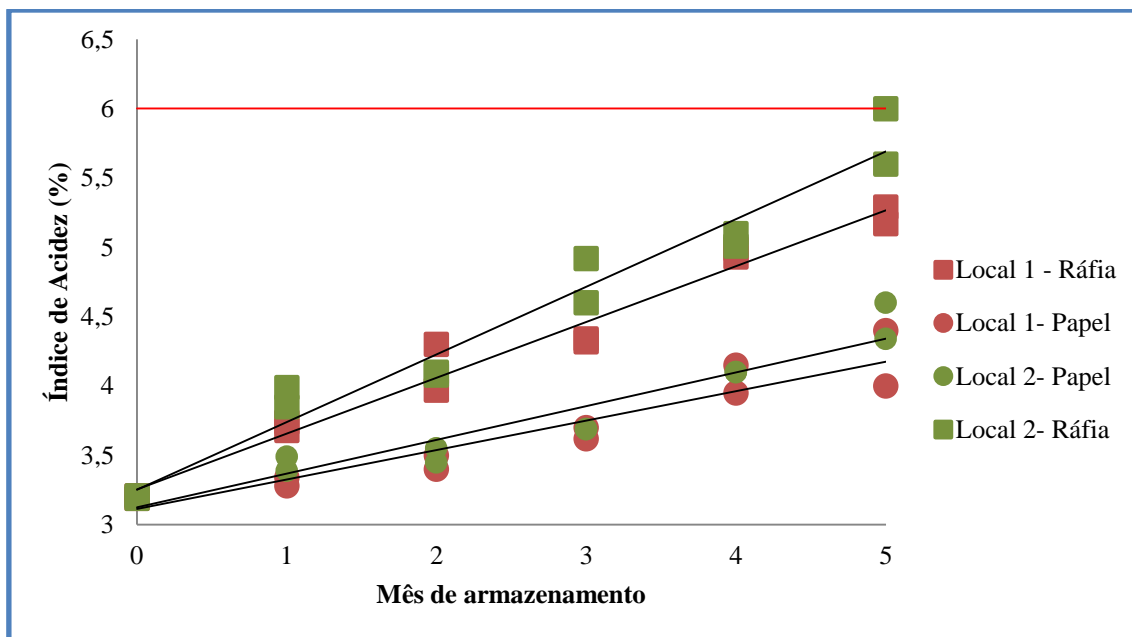


Local 2- Ráfia, reforçando a ideia de que este tipo de ensaque é de facto o mais prejudicial para este tipo de produto, ao qual é permeável ao contacto com o oxigénio e aumento de temperatura como já demonstrado em diversos estudos (Talbot, 2016; Tsutzuki et al. 2014).



**Figura 21** – Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 2-Cachorros ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

Também em relação ao índice de acidez, uma variação de  $2,4 \pm 0,4$  % faz com que mais uma vez a ração armazenada no Local 2 em embalagem de ráfia atinja os valores mais elevados quando comparativamente a todas as outras, sendo que as rações ensacadas a papel demonstram uma maior estabilidade a nível do índice de acidez.



**Figura 22** – Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 2- Cachorros ao longo do tempo de armazenamento (%); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

Uma possível justificação para um aumento considerável tanto a nível da oxidação como a nível do índice de acidez em relação aos resultados previamente apresentados relativamente ao Tipo 1- Manutenção poderá ser a incorporação de farinha de peixe, que pela catálise do grupo heme que originará a formação de hidroperóxidos assim com o facto de um aumento no número de gorduras insaturadas causado pela presença tanto de farinha de peixe como de uma maior percentagem de farinha de aves inerente à formulação deste tipo de rações (Leeson et al., 2005).

Como concluído por Kim et al. (2014) e Mujahid et al. (2005), o aumento da libertação de ácidos gordos (índice de acidez), é influenciado pela hidrólise dos triglicerídeos na presença de água. Apesar do tratamento térmico que as farinhas de subproduto animal sofreram e do processo de extrusão utilizado para a produção da ração final, foi ainda visível um aumento considerável no final dos 5 meses de armazenamento quando comparado com o valor inicial. Segundo Sayre et al. (1985), que estudou ao longo de seis semanas de armazenamento o efeito de teor de humidade na deterioração de farinha de arroz, quanto maior for o teor de humidade (10,6% a 4,8% neste estudo) presente na amostra, maior será a actividade de enzimas que provocam a libertação de ácidos gordos. Quando a temperatura de extrusão é maior, o teor de humidade é menor e consequentemente a atividade enzimática é também menor. Mesmo

para teores de humidade de 4,8% e temperaturas de extrusão de 140 °C, existe atividade lipolítica em produtos extrudados, levando ao aumento do teor de acidez.

### Tipo 3 - Gatos

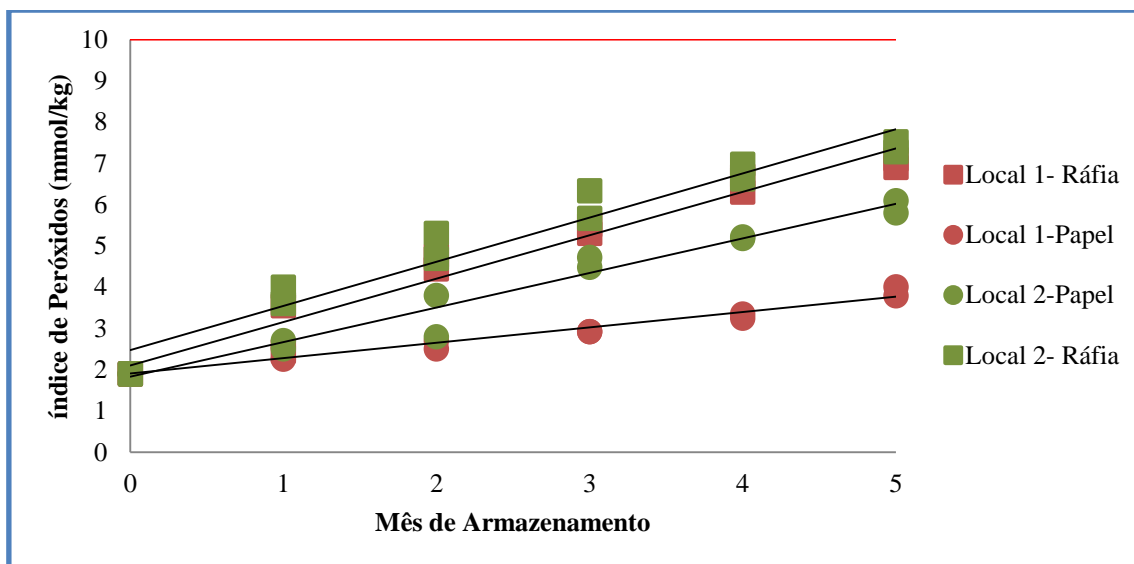
O produto final Tipo 3- Gatos assemelha-se consideravelmente à ração do Tipo 2- Cachorros a nível de composição percentual de subprodutos de origem animal, caracterizando-se por um teor de gordura de 13%, este apresenta um comportamento linear em todas as diferentes referências, sendo que mais uma vez a referência Local 2- Ráfia se revela como a que mais alterações sofre, passando de uma valor inicial de **1,9 mmol/kg** para **7,4±0,12 mmol/kg**.

**Tabela 20** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção de produto final Tipo 3-Gatos  
(% em relação à constituição total);

	<b>Farinha de Carne e Osso (%)</b>	<b>Farinha de Aves (%)</b>	<b>Farinha de Peixe (%)</b>	<b>Gordura (%)</b>
<b>Tipo 3 Gatos</b>	24-27	15-16	1-2	1,7

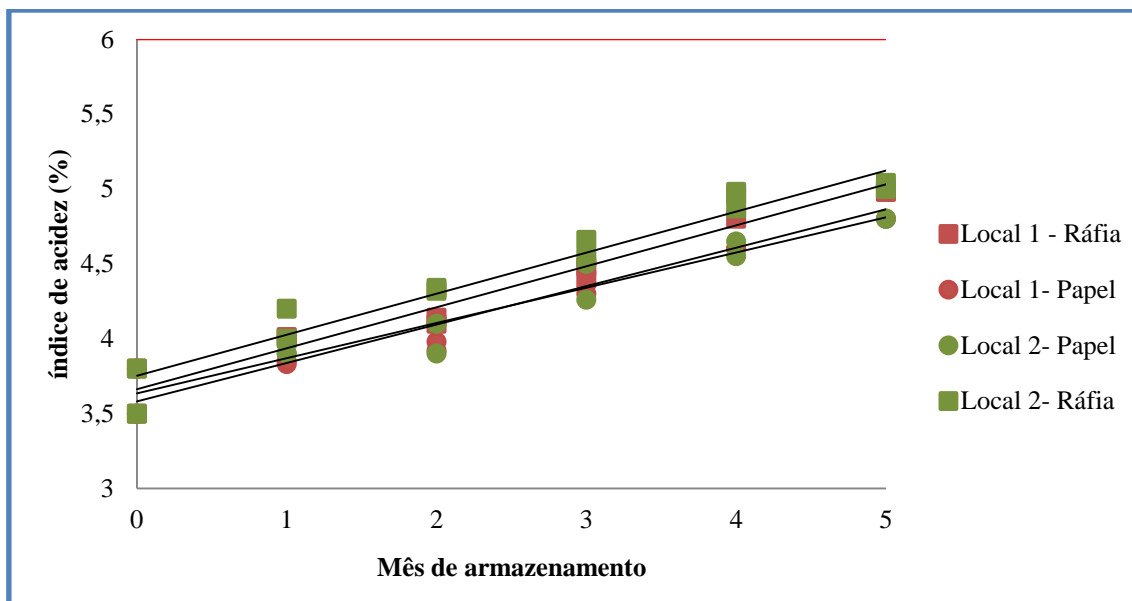
A referência Local 1- Ráfia apresenta também um valor no final dos 5 meses muito próximo de **7,0±0,1 mmol/kg**, provando mais uma vez a sensibilidade a que o produto está sujeito quando acondicionado nestas condições, visto que nesta situação, a utilização de papel na envoltória dos produtos leva a que estes assumam valores finais relativamente inferiores como **6,04±0,6 mmol/kg** para a referência Local-2 Papel e de **3,90±0,11 mmol/kg** para a referência Local 1- Papel. Pelos resultados apresentados, relativamente ao mesmo tipo de ensaio, nota-se que a referência armazenada no Local 2 resulta sempre em valores de oxidação e acidez superiores ao Local 1. Estes resultados estão de acordo com os trabalhos de Tsuzuki et al. (2014) que demonstraram que o armazenamento de matérias-primas como a farinha de trigo (base da constituição de *pet food*) foi influenciado negativamente pelo aumento de temperatura (de 4°C para 26 °C) ao longo de oito semanas de armazenamento, chegando a duplicar o índice de ácidos gordos livres. Gross et al. (2013) mostraram que, apesar da aplicação de antioxidantes como Etoxiquina e BHA em alimentos secos destinados a cães, as

temperaturas de armazenamento superiores levam a valores mais elevados de oxidação. No entanto, em ambos os casos de armazenamento a diferentes temperaturas, os produtos permaneceram dentro dos limites aceitáveis (10 mmol/kg), tal como registado neste trabalho em relação ao Tipo 3 – Gatos.



**Figura 23** – Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo3-Gatos ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

Os valores apresentados relativos ao índice de acidez do produto final Tipo 3 revelaram-se bastante próximos, mostrando uma vez mais que o índice de acidez não apresenta grandes variações de valores ao final de todo o tempo de armazenamento, verificando-se apenas uma variação de cerca de **0,24%** entre o valor mais baixo registado (Local 1-Papel) e o mais alto (Local 2-Ráfia), esta baixa variação poderá ser justificada pela baixa variação do índice de acidez da farinha de aves ao longo do tempo de armazenamento (registou um aumento percentual de apenas **4,4%**) visto que este tipo de produtos utiliza farinha de aves em grande percentagem como matéria-prima.



**Figura 24**– Acompanhamento do índice de acidez em produto final do Tipo 3-Gatos ao longo do tempo de armazenamento (%); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

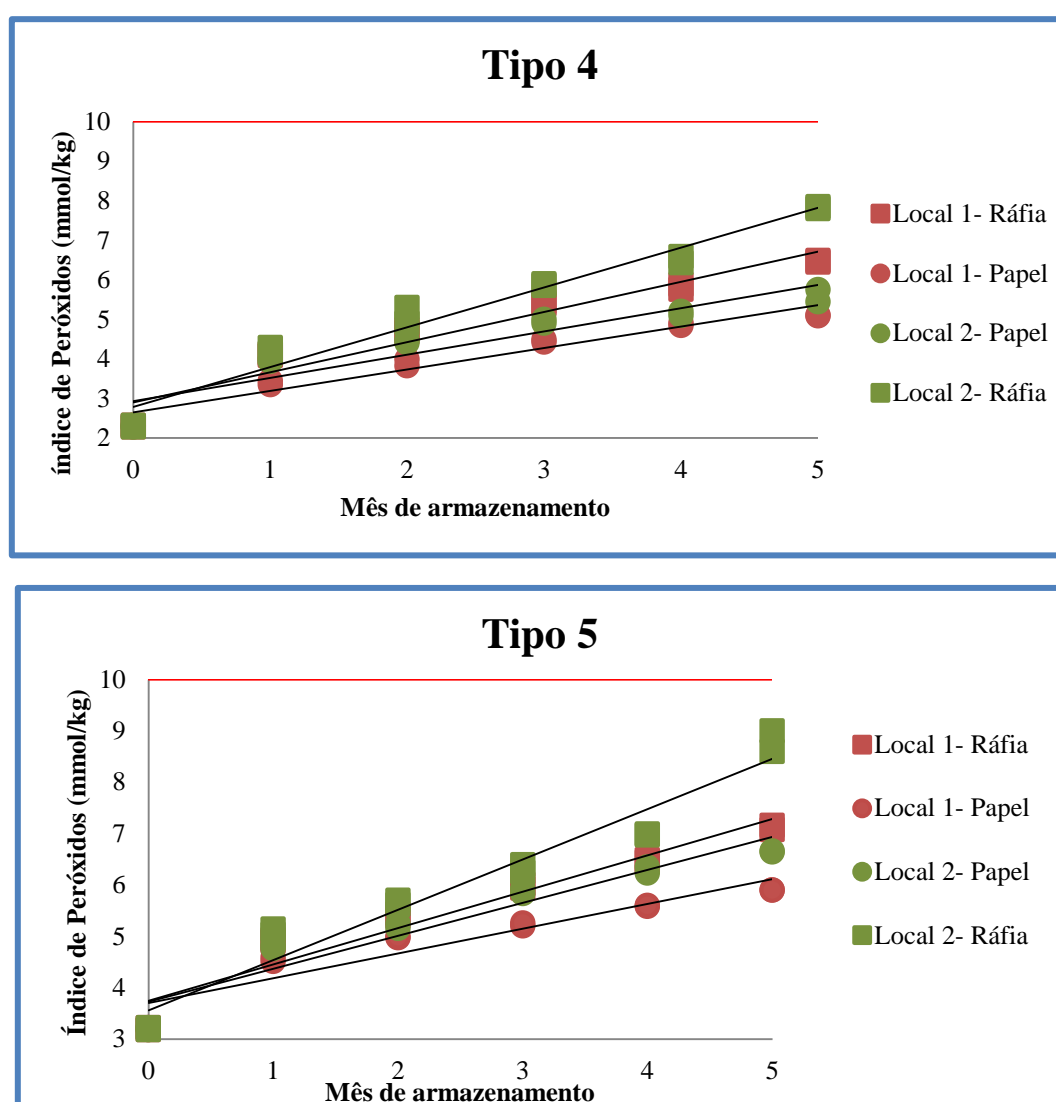
## Tipo 4 –Alta Energia e Tipo 5- Alta Energia Extra

Os produtos finais de Tipo 4 e 5, caracterizados por serem os produtos testados com maior teor em gordura a nível de produto final, **14%** e **15%** respetivamente, apresentam um comportamento bastante semelhante entre eles.

**Tabela 21** – Proporção de diferentes subprodutos utilizados na produção de produto final Tipo 4- Alta Energia e Tipo5-Alta Energia Extra (% em relação à constituição total);

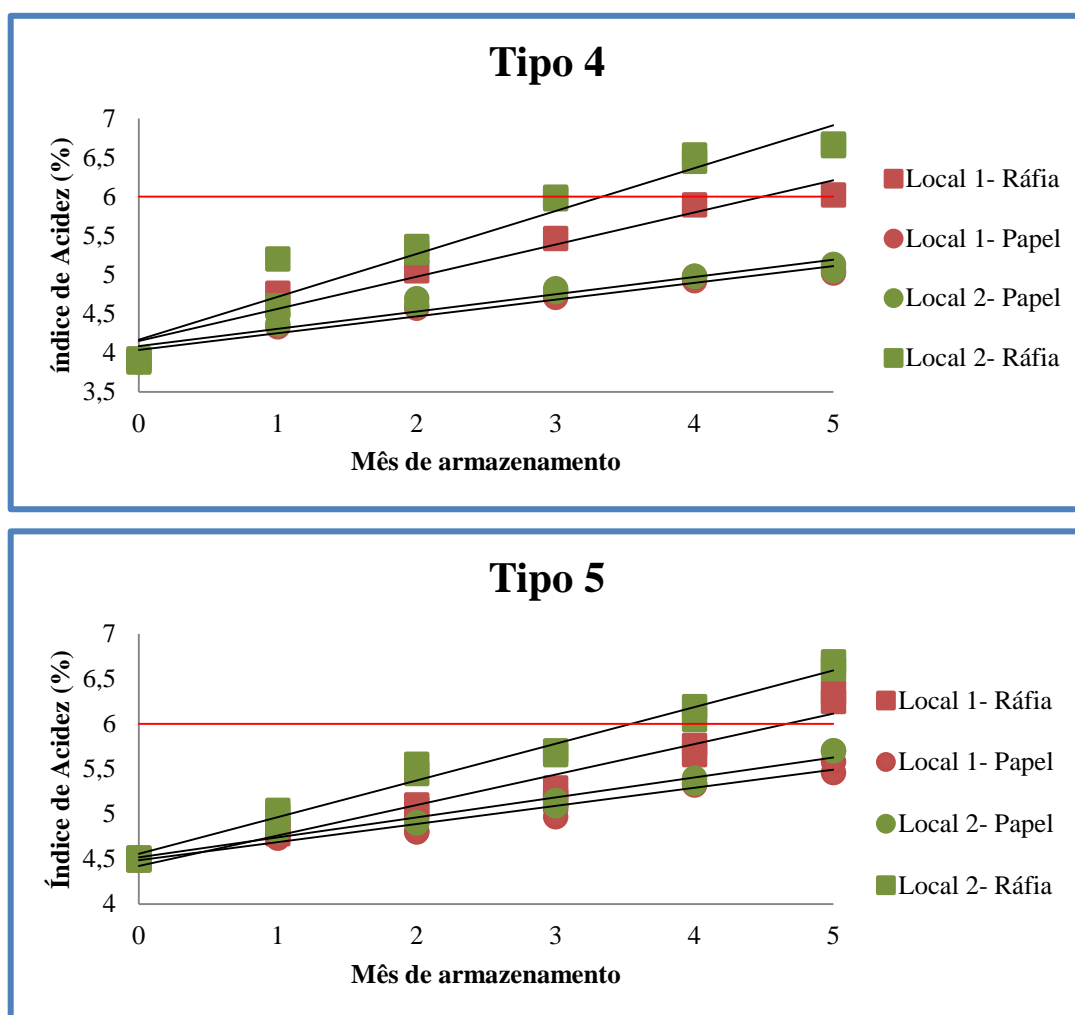
	Farinha de Carne e Osso (%)	Farinha de Aves (%)	Farinha de Peixe (%)	Gordura (%)
<b>Tipo 4 Alta Energia</b>	25-27	13-15	-	4-5
<b>Tipo 5 Alta Energia Extra</b>	27-29	15-17	-	5

Em ambos os tipos, a referência Local 2- Ráfia é a que se destaca das demais, atingindo os valores  **$7,83 \pm 0,2$  mmol/kg** no Tipo 4 e  **$8,8 \pm 0,2$  mmol/kg** no tipo 5 ao fim de 5 meses de armazenamento. A evolução índice de peróxidos desde o ensaque para o primeiro mês: de  **$2,30 \pm 0,02$  mmol/kg** para  **$4,22 \pm 0,07$  mmol/kg** no tipo 4 e de  **$3,2 \pm 0,02$  mmol/kg** para  **$5,09 \pm 0,06$  mmol/kg** no tipo 5, o que vem de certa forma mostrar que para produtos com maior teor em gordura, é mais evidente que é após a fase inicial, ou seja, já numa fase de propagação que existe uma maior variação no valor de peroxidação dos produtos existindo naturalmente nos meses posteriores de facto um aumento a nível de peróxidos mas sendo ele gradual ao longo do tempo (Gray, 2015).



**Figura 25** – Acompanhamento do índice de peróxidos em produto final do Tipo 4-Alta Energia e Tipo 5-Alta Energia Extra ao longo do tempo de armazenamento (mmol/kg); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

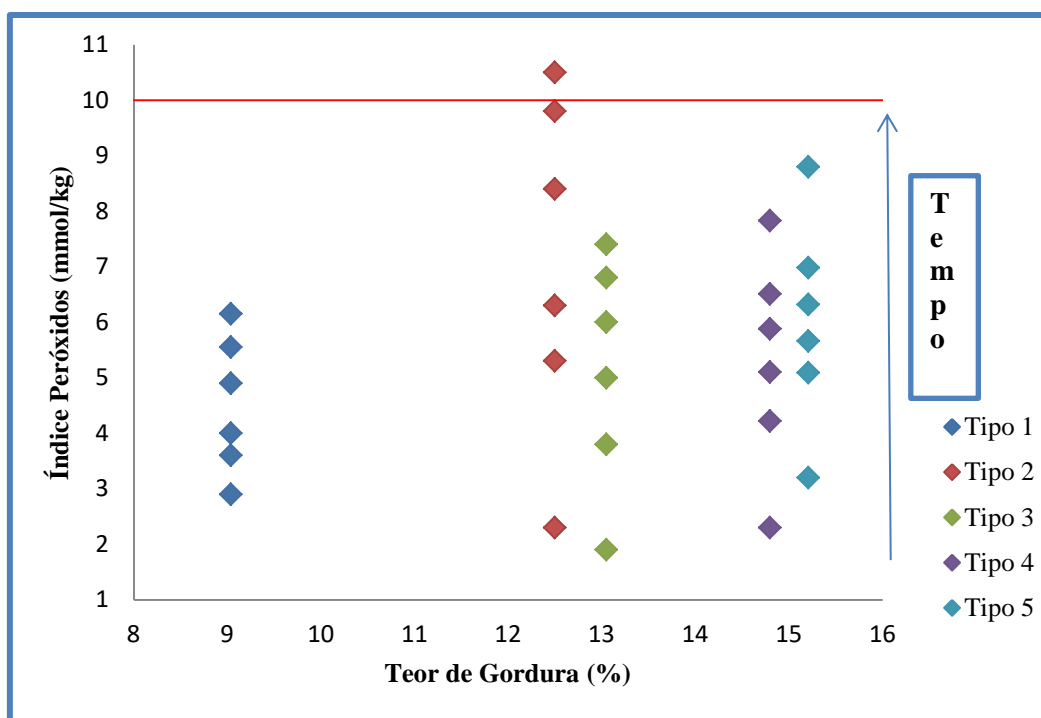
A nível de acidez, também o Tipo 4 e 5 apresentam comportamentos muito semelhantes, sendo que as rações embaladas em rafia, tanto no Local 1 como o Local 2, excedem até os valores limites aconselháveis de 6%. Em ambos tipos, as rações armazenadas em Papel distanciam-se razoavelmente das rações armazenadas em Rafia, apresentando declives bastante diferenciados como perceptível pela Figura 26 mostrando mais uma vez que este tipo de acondicionamento se revela mais seguro quando comparado com a utilização de rafia, que se caracteriza por um tipo de embalagem mais permeável ao oxigénio. Comparando os dois tipos de ração que se encontram acondicionadas em rafia, vemos que o factor da temperatura de armazenamento é o factor que permite diferenciar ambas, visto que uma das rações está armazenada no Local 2 (maior temperatura) e outra no Local 1, sendo que a ração armazenada no Local 2 apresenta um declive ainda maior do que a ração armazenada no Local 1.



**Figura 26-** Acompanhamento do índice de acidez em produto final do tipo 4 e 5 ao longo do tempo de armazenamento (%); Linha a vermelho: Limite máximo aconselhável.

#### 4.4 Relação Índice de Peróxidos e Acidez em teor de Gordura

Visto que as rações armazenadas no Local 2 ensacadas em rafia foram as que maior variação de resultados apresentaram ao longo do tempo de armazenamento, é sobre esta condição que se analisará todos os tipos de rações de um ponto de vista geral a relação entre o valor de peróxidos e acidez e o teor de gordura de cada produto final estudado.



**Figura 27-** Relação entre valor de peróxidos e teor de gordura na referência Local2-Rafia de todos os produtos finais: Tipo 1-Manutenção, Tipo 2-Cachorros, Tipo 3-Gatos, Tipo 4-Alta Energia, Tipo 5-Alta Energia Extra.

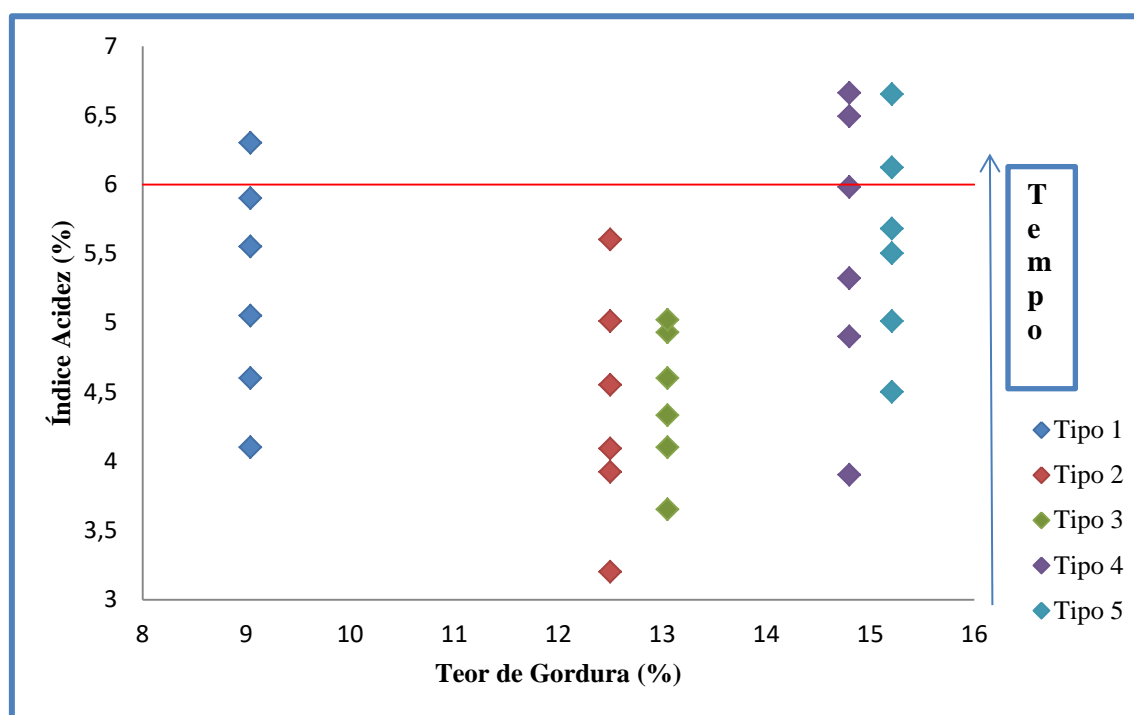
Produto final Tipo 1 apresenta os valores mais baixos de peróxidos, que poderá ser justificado pela menor quantidade de gordura percentual (9,04%) quando comparado com outros tipos. Para além deste aspecto, a não utilização de farinha de peixe assim como uma menor percentagem utilizada de gordura e farinha de aves são fatores que poderão ajudar a explicar um menor valor final de oxidação como se pode ver pela Figura 27.

As rações Tipo 2 e Tipo 3, destinadas a Cachorros e Gatos, têm já uma composição diferente apresentada no Tipo 1. Na sua constituição contêm uma maior quantidade de gordura (Tabela 17), o que por si só pode justificar o aumento do valor de oxidação. A utilização de por exemplo farinha de peixe nestas rações vai também aumentar a taxa de



oxidação, visto que a presença do grupo heme e um maior número de gordura insaturada, em contacto com o oxigénio, despoletam as reações de formação de hidroperóxidos, como explicado previamente. Outro dos fatores a influenciar as diferenças de valores de peróxido dos tipos 2 e 3 comparativamente ao tipo 1 são os tipos de gorduras que são incorporados nestas rações como a farinha de aves que contém mais gorduras insaturadas do que as farinhas de carne e de ossos, tornando-se mais susceptível à oxidação comparativamente à farinha de carne e ossos (Leeson et al., 2005).

Os Tipos de ração 4 e 5 apresentam como já referido teores de gordura e proteína mais elevados do que todas as outras referências (Tabela 17), apresentando assim naturalmente um valor de oxidação superior às referências Tipo 1 e Tipo 3, existindo uma correlação entre o aumento teor de gordura e o aumento teor de peróxidos assim como relativamente ao índice de acidez, o qual se denota um valor mais elevado nos Tipos 4 e 5.



**Figura 28** - Relação entre índice de acidez e teor de gordura na referência Local2-Ráfia de todos os produtos finais: Tipo 1-Manutenção, Tipo 2-Cachorros, Tipo 3-Gatos, Tipo 4-Alta Energia, Tipo 5-Alta Energia Extra.

A diferença a nível de acidez (Figura 28) em que o tipo 2 e 3 apresentam valores menores do que a referência Tipo 1 poderá estar relacionado com o facto de que na

produção destes dois tipos de rações utilizam farinhas como a de aves e de mistura de aves que apresentaram valores e variações de acidez muito reduzidas (Tabela 16), auxiliando a manter este índice controlado no produto final. Estas matérias-primas por um lado são benéficas no controlo da acidez mas despoletam mais facilmente fenómenos de oxidação, com um grande aumento do índice de peróxidos. Para além do aspeto relacionado com os diferentes subprodutos utilizados na produção das diferentes rações, outro fator que pode contribuir para uma menor variação dos valores de peróxidos e acidez no Tipo 3- Gatos poderá estar relacionado com o facto de esta ração ser a única que utiliza, para além dos antioxidantes BHT e Etoxiquina, o Galato de Propilo como substância auxiliar no processo de prevenção/retardamento de deterioração do produto.

## **5. Considerações Finais**

O processo de extração da gordura mostrou-se mais eficaz quanto mais renovações de solvente forem realizadas. No entanto, a partir de um determinado número de extrações, o rendimento não aumenta. A otimização do processo permitiu chegar à conclusão que 4 renovações do solvente utilizando 120 mL, com um tempo total de 40 minutos de contacto entre o solvente e a amostra, é a metodologia mais indicada para obter o máximo rendimento tendo em conta a quantidade de gordura obtida, o tempo total de extração e os gastos de solvente.

A gordura de aves é um produto altamente influenciado pela temperatura à qual está sujeita, sendo que sem adição de antioxidante este tipo de produtos pode atingir uma variação dos teores de peroxidação de 4,71 mmol de oxigénio por kilograma de amostra, atingindo um valor final de 12,6 mmol/kg. A adição de antioxidante mostrou ser uma estratégia eficaz para minimizar a peroxidação lipídica da gordura de aves.

Dos subprodutos de origem animal analisados ao longo do tempo de armazenamento a nível de peróxidos e acidez, as farinhas de carne mostraram que um maior nível de peróxidos não está directamente relacionado com um maior índice de acidez.

Em relação aos diferentes subprodutos, pode-se concluir que a gordura de aves é a matéria-prima que apresenta resultados de oxidação lipídica mais preocupantes devido à elevada temperatura a que normalmente é armazenada, o que faz com que sofra

aumentos de valores de peróxidos e acidez acima dos limites desejáveis. Torna-se necessário o uso de antioxidante ou reduzir a temperatura do silo interior para prevenir a oxidação lipídica.

Relativamente às diferentes farinhas de subproduto de origem animal, a matéria-prima que apresentou uma maior taxa de oxidação lipídica foi a farinha de peixe, embora o valor final de peróxidos fosse relativamente baixo. Correlacionando o tempo de armazenamento com a variação de valor de peróxidos, conclui-se que a farinha de carne e osso- Tipo A, apresentaram em apenas seis dias de armazenamento uma variação que permitiu chegar ao valor mais alto de todas as farinhas de subproduto de origem animal (6,31 mmol/kg), o que pode também ser explicado pelo alto valor inicial de peróxidos. As Farinhas de Aves, Farinha de Penas, Farinha de Mistura de Aves e Farinha de Carne e Osso-Tipo B mostraram todas elas valores finais de peroxidação abaixo dos limites máximos recomendáveis e com variações apenas na Farinha de Penas superiores a 20% (21,4%) a nível de oxidação lipídica.

A análise ao índice de acidez permitiu concluir que nenhuma das farinhas de subproduto de origem animal ultrapassou os limites aconselháveis.

As avaliações efetuadas ao produto final mostraram que o tipo de embalagem e o local de armazenamento têm influência na manutenção da qualidade do produto. Um local com temperatura superior e mais amplo, juntamente com um tipo de saco mais permeável ao oxigénio/temperatura, demonstrou valores mais elevados tanto de peróxidos como de acidez. O tipo de embalagem de ráfia mostrou ser o mais prejudicial em relação à promoção da oxidação e acidez no produto final. Comparando os produtos ensacados em ráfia, vê-se também que os produtos armazenados a temperaturas inferiores mostraram um comportamento mais desejável. O mesmo se observou para produtos ensacados em papel. A nível da oxidação lipídica, a ração que apresentou um valor final mais aceitável a nível geral foi a Tipo1- Manutenção, seguido do Tipo 3-Gatos, Tipo 4-Alta energia e Tipo 5-Alta Energia Extra. O Tipo 2-Cachorros apresentou um maior desvio e valores de oxidação superiores em comparação com outras rações, tendo mesmo ultrapassado os limites desejáveis quando armazenado em embalagem de ráfia e em local com temperatura média superior.

Também a nível de acidez os produtos ensacados em embalagens de ráfia e armazenados a temperatura superior demonstraram comportamentos menos desejáveis. Neste caso, a referência Tipo 2-Cachorros e Tipo 3-Gatos foram as que obtiveram

resultados mais favoráveis, sendo que as rações Tipo 1-Manutenção, Tipo 4-Alta Energia e Tipo 5-Alta Energia Extra ultrapassaram os limites aconselháveis em embalagens de rafia aquando armazenadas a temperaturas superiores.

Este estudo mostra que a análise da peroxidação lipídica e acidez permite a identificação na empresa do estado de conservação tanto das matérias-primas como das rações para animais. A conservação em sacos de rafia deve ser evitada, tal como o armazenamento de matérias-primas e rações a temperaturas mais elevadas. Sugere-se que o armazenamento se faça em sacos impermeáveis ao oxigénio, como o papel ou o plástico, e a temperaturas não superiores a 18 °C.

## 6. Trabalho Futuro

Perante o trabalho realizado durante este estudo, seria interessante no futuro:

- Prolongar o estudo até o produto final perfazer um ano de armazenamento, que corresponde ao tempo de validade do mesmo de forma a testar a hipótese de um prolongamento do tempo de validade do produto, visto que ao longo do tempo de armazenamento a maior parte dos produtos finais ainda se encontravam relativamente distantes do valor limite aconselhável a nível de peróxidos, assim como também avaliar a utilização de plástico como embalagem que agora surge com alguma expressão no mercado.
- Conseguir perceber até que ponto a rancificação de um produto tem interferência direta com a maior ou menor intensidade de odor do mesmo e partindo desse ponto, recorrendo a técnicas como a cromatografia em fase gasosa, analisar a presença de compostos marcadores de ranço que pudesse permitir a avaliação de conforme ou não conforme, o que levaria a uma redução da utilização de diversos solventes utilizados durante todo o processo de extração e análise de peróxidos e tornaria o processo menos moroso e trabalhoso.

## 7. Referências Bibliográficas

AAFCO - Association of American Feed Control Officials. Disponível em: [http://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Regulatory/Committees/Pet-Food/Reports/Pet\\_Food\\_Report\\_2013\\_Midyear-Proposed\\_Revisions\\_to\\_AAFCO\\_Nutrient\\_Profiles.pdf](http://www.aafco.org/Portals/0/SiteContent/Regulatory/Committees/Pet-Food/Reports/Pet_Food_Report_2013_Midyear-Proposed_Revisions_to_AAFCO_Nutrient_Profiles.pdf) . Acesso em Dezembro de 2015

AEP - Associação Empresarial de Portugal. Expozoo, 2012. Disponível em: [http://aep.org.pt/docs/aep-estudos/expozoo-\(julho-2012\).pdf](http://aep.org.pt/docs/aep-estudos/expozoo-(julho-2012).pdf) Acesso em Dezembro de 2015.

Akoh, C. C., Min, D. B. Erickson, M. C. Food Lipids: Chemistry, Nutrition, and Biotechnology. Nova Iorque, 2008.

Antolovich, M., Prenzler, P. D., Patsalides, E., McDonald, S., Robards, K. Methods for testing antioxidant activity. *Analyst*, 183-198, 2002.

Bardócz, S., Grant G., Brown D.S., Ralph A., Pusztai A. Polyamines in food – implications for growth and health. *Journal of Nutricional Biochemistry*, 4, 66-71, 1993.

Beuchat, L.R. Influence of water activity on growth, metabolic activities, and survival of yeasts and molds. *Journal of Food Protection*, 46, 135-141, 1983.

Belitz, H.; Grosch, W.; Schieberle, P.; *Food Chemistry*, 4ª edição. Springer, Berlim, 2009.

Bellaver, C. Ludke, J. Lima, G.J.M.M. Qualidade de ingredientes para rações. Global Feed and Food Forum. São Paulo, 2005.

Boskou, D., Elmadfa, I. Oxidation Products and Metabolic Processes. *Frying of Food: Oxidation, Nutrient and Non-Nutrient Antioxidants, Biologically Active Compounds, and High Temperatures*, 2ª edição, 2, 23-48, 2010.

Brum, A.A.S. Arruda, L.F. Regitano-D'Arce, M.A.B. Métodos de extração e qualidade da fração lipídica de matérias-primas de origem vegetal e animal. *Química Nova*, 32, 849-854, 2009.

Butolo, J. E. Qualidade de ingredientes na alimentação animal. CBNA. São Paulo, 2002.

Carciofi A. C. Jeremias J.T. Progresso científico sobre nutrição de animais de companhia na primeira década do século XXI. *Revista Brasileira Zootecnia*, 39, 35-41, 2010.

Case, L. P., Daristotle, L. D., Hayek, M. G., Raasch, M. R. A Resource for Companion Animal Professionals. *Canine and Feline Nutrition*. Elsevier Health Sciences, 2011.

Catala, A. An overview of lipid peroxidation with emphasis in outer segments of photoreceptors and the chemiluminescence assay. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 38, 617-631, 2006.

Catala, A. A synopsis of the process of lipid peroxidation since the discovery of the essential fatty acids. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 399, 318-323, 2010.

Chen, H., Xu, S., & Wang, Z. Gelation properties of flaxseed gum. *Journal of Food Engineering*, 77, 295-303, 2006.

Chow, C. K., Tatum, V. Effects of Processing and Storage on Fatty Acids in Edible Oils. *Fatty Acids in Foods and Their Health Implications*, 3, 493-510, 2008.

Cramer, K. R., Greenwood, M. W., Moritz, J. S., Beyer, R. S., Parsons, C. M. Protein quality of various raw and rendered by-product meals commonly incorporated into companion animal diets. *Journal of Animal Science*, cap. 85, p. 3285-3293, 2007.

Denisov, E. T., Afanas'ev, I. B. Oxidation as an Autoinitiated Chain Reaction. *Oxidation and Antioxidants in Organic Chemistry and Biology*, cap. 4, p. 137-181, 2005.

Estrela-Animal. Imagem disponível em <http://www.estrelanimal.pt/caes/alimentacao.html>). Acesso em Janeiro de 2016.

Fahey, G. C. Research needs companion animal nutrition. *Pet food technology*, p.135-140, Illinois, 2003.

Fahey, G. C.; Barry, K. A.; Swanson, K. S. Age-related changes in nutrient utilization by companion animals. *The Annual Review of Nutrition*, 28, 425-445, 2008.

França, J. Alimentos convencionais vs naturais para cães adultos. Tese de Doutorado em Nutrição Animal – Universidade Federal de Lavras. Lavras, 2009.

Frankel EN. Recent Advances in Lipid Oxidation. *Journal Science Food Agriculture*, 54, 495-511, 1991.

Frankel EN, Neff W E, Miyashita K. Autoxidation of polyunsaturated triacylglycerols. Trilinolenoylglycerol. *Lipids*, 25, 40-47, 1990

Gordon, M. H. Factors affecting lipid oxidation. Em: Steele, R. Understanding and Measuring the Shelf-life of Food, Woodhead Publishing, 7, 128-141, 2004.

Gordon, M. H., Yanishlieva, N., Pokorny, J. Antioxidants in Food: Practical Applications, Woodhead Publishing, Ltd, 7-21. Cambridge, 2001.

Gray, M. Evaluation of oxidized rendered protein meals in pet foods. Department of Grain Science & Industry College of Agriculture. Manhattan, 2015.



Gross, K. L., Bolinger, R., Thawngmung, P., Collins, G. F. Effect of Three Different Preservative Systems on the Stability of Extruded Dog Food Subjected to Ambient and High Temperature Storage. *Nutrition Through the Life Cycle*, 2638-2642, 2013.

Hamilton, R. J.; Rossell, J. B.; Hudson, B. J. F.; Lölinger, J.; Rancidity in Foods. *Applied Science Publishers LTD*. Londres, 1983.

HRS4pets. Imagem disponível em: <http://hrs4pets.com/about-dog-food/>. Acesso em Janeiro de 2016.

IACA – Associação Portuguesa dos Industriais de Alimentos Compostos para Animais. Anuário 2015. Disponível em: [http://issuu.com/alimentação\\_animal/docs/anu\\_\\_rio\\_iaca2015](http://issuu.com/alimentação_animal/docs/anu__rio_iaca2015) . Acesso em Dezembro de 2015.

Jadhav, S. J.; Nimbalkar, S. S.; Kulkarni, A. D.; Madhavi, D. L.; Rajalakshmi, D.; Narasimhan, S. *Food Antioxidants: Technological, Toxicological, and Health Perspectives*, 5. New York, 1996.

Ladikos, D., Lougovois, V. Lipid Oxidation in Muscle Foods: A Review. *Food Chemistry*, 35, 295-314, 1990.

Leeson, S. I., Summers, J.D. Ingredient Evaluation and Diet Formulation: Description of Ingredients. *Commercial Poultry Nutrition*. Nottingham University Press, 50, 2005.

Li X.; Rezaei R.; Li P.; Wu G. Composition of amino acids in feed ingredients for animal diets. *Amino Acids*, 40, 1159-1168, 2011.

Kanner, J. Oxidative processes in meat and meat products: quality implications. *Meat Science*, 36, 169-189, 1994.

Kim, Sung-Min; Chung, Hyun-Jung; Lim, Seung-Taik. Effect of various heat treatments on rancidity and some bioactive compounds of rice bran. *Journal of Cereal Science*, 60, 243-248, 2014.

Koppel, K.; Adhikari, K.; Di Donfrancesco, B. Volatile compounds in dry dog foods and their influence on sensory aromatic profile. *Molecules*, 18, 2646-2662, 2013.

Kwon T. W.; Brown H. G. Oxidative stability of soybean oil at different stages of refining, *Journal American Oil Chemist's Society*, 61, 1843-1846, 1984.

Machado, E. H. L.; Alves, L. C.; Faustino, M. A. G. et al. Frequência de insetos-praga em alimento industrializado para cães comercializado na cidade de Recife-PE. *Medicina Veterinária*, 2, 10-16, 2008.

Matias, C.F.Q., Lara, L.J.C.; Baião, N.C.; Cardoso, D.M.; Baião, R.C.; Utilização de farinhas de origem animal na avicultura. *Nutritime*. Artigo 175, 9, 1944–1964, 2012.

Market Access Secretariat. Pet Food in the European Union. Agriculture and Agri-Food. Disponível em: <http://www.agr.gc.ca/resources/prod/Internet-Internet/MISB-DGSIM/ATS-SEA/PDF/6730-eng.pdf>. Canada, 2016.

Melo, E. A.; Guerra, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. *SBCTA- Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 36, 1-11, 2002.

Milani, L. I. G.; Terra, N. N.; Fries, L. L. M. Oxidação lipídica, características sensoriais e cor da carne de frango adicionada de extratos de caqui (*Diospyros kaki*) e submetida a tratamento térmico. *Journal Food Technology*, 4, 242-250, 2010.

Min, D. B., Ellefson, W. C., Nielsen, S. S. Fat Analysis. *Food Analysis*, 8, 117-134, 2010.

Morey, K.S., Hansen, S.P., Brown, W.D. Reaction of hydrogen peroxide with myoglobins. *Journal of Food Science*, v. 38, 1104-1107. Chicago, 1973.

Mujahid, A., Haq, I., Asif, M., Gilani, A.H. Effect of various processing techniques and different levels of antioxidant on stability of rice bran during storage. *Journal of the Science of Food Agriculture*, 85, 847-852, 2005.

Murray, S. M., Patil, A. R., Fahey, G. C., Merchen, N. R., Hughes, D. M. Raw and rendered animal by-products as ingredients in dog diets. *Journal of Animal Science*, 75, 2497-2505, 1997.

Naila A, Flint S, Fletcher G, Bremer P, Meerdink G. Control of Biogenic Amines in Food—Existing and Emerging Approaches. *Journal of Food Science*. 75, 139-150, 2010;

O' Keefe, S. F., Pike, O. A. Nielsen, S. S. Fat Analysis. *Food Analysis*, 14, 239-262, 2010.

Osawa, C. C.; Gonçalves, L. A. G.; Ragazzi, S. Evaluation of the quality of pet foods using fast techniques and official methods. *Food Science Techonology*, 28, 223-230, 2008.

Sayre, R. N., Nayyar, D. K., and Saunders, R. M., Extraction and refining of edible oil from extrusion-stabilized rice bran. *Journal of American Oil Chemists Society*, 62, 1040, 1985.

Scapim, M. R. S; Loures, E. G.; Rostagno, H. S.; Cecon, P. R.; Scapim, C. A. Avaliação nutricional da farinha de penas e de sangue para frangos de corte submetida a diferentes tratamentos térmicos. *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 25, 91-98, 2003.

Scheuermann, G. N.; Rosa, P. S. Farinhas de origem animal na alimentação de monogástricos: a qualidade dos produtos define seu potencial de utilização, Boletim Pecuário, 2007. Disponível em: <http://www.boletimpecuario.com.br/notes/noticia.php?not=ancora2744>. Acesso em: 4 de Janeiro, 2016.

Shahidi, F., Pegg, R. B. Hexanal as an indicator of meat flavor deterioration. *Journal of Food Lipids*, 1, 177-186, 1994.

Shahidi, F., Wanasundara, U. N., Akoh, C. C., Min, D. B. *Food Lipids: Chemistry, Nutrition and Biotechnology*. CRC Press, 465-487. New York, 2002.

Shahidi, F., Zhong, Y. Measurement Methods. *Bailey's Industrial Oil and Fat Products, Edible Oil and Fat Products, Lipid Oxidation*, 8, 357-385, 2005.

Silva, F. A. M.; Borges, M. F. M.; Ferreira, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. *Química Nova*, 22, 94-103, 1999.

Simopoulos, A. P. Omega-6/Omega-3 Essential Fatty Acid Ratio and Chronic Diseases. *Food Reviews International*, 20, 77-90, 2004.

Smith, T. K. Effect of dietary putrescine on whole body growth and polyamine metabolism. *Experimental Biology and Medicine*, 194, 332-336, 1990.

Sousadias, M.G. Smith, T.K. Toxicity and growth-promoting potential of spermine when fed to chicks. *Journal of Animal Science*, 73, 2375-2381, 1995.

Talbot, G. The Stability and Shelf Life of Fats and Oils, em *The Stability and Shelf Life of Food. Food Science, Technology and Nutrition*, 2ª edição, p. 461-503, 2016.

Texture Technologies. Imagem disponível em:  
<http://texturetechnologies.com/blog/images/petfood.jpg> . Acesso em Janeiro de 2016.

Thompson A. Ingredients: where Pet Food Starts. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23, 127-132, 2008.

Tims, M.J., Watts, B.M. Protection of cooked meats with phosphates. *Food Technology*, 12, 240-243, 1958.

Tzortzis, G.; Gibson, G. R.; Rastall, R. A. Food Science and Technology Bulletin. *Canine functional foods*, 1, 1-11, 2003.

Tsuzuki, W., Suzuki, Y., Yamada, S., Kano, S., Ohnishi, H., Fujimoto, T., Horigane, A. Effect of oxygen absorber on accumulation of free fatty acids in brown rice and whole grain wheat during storage. *Food Science Technology*, 58, 222-229, 2014.

Vas, G., V., K. Solid-phase microextraction: a powerful sample preparation tool prior to mass spectrometric analysis. *Journal of Mass Spectrometry*, 39, 233-254, 2004.

Zicker, S.C. Evaluating Pet Foods: How confident are you when you recommend a commercial pet food?. *Topics in Companion Animal Medicine*, 23, 121-126, 2008.